



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE CULTURA *IN VITRO* DE  
CÉLULAS LÚTEAS BOVINAS PARA ESTUDAR AS INTERACÇÕES COM  
EMBRIÕES EM CO-CULTURA**

MARIANA RAPOSO BATISTA

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutor Fernando António da Costa  
Ferreira

**ORIENTADOR**

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

2011

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE CULTURA *IN VITRO* DE  
CÉLULAS LÚTEAS BOVINAS PARA ESTUDAR AS INTERACÇÕES COM  
EMBRIÕES EM CO-CULTURA**

MARIANA RAPOSO BATISTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus  
Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutor Fernando António da Costa  
Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

2011

LISBOA

---

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Luís Filipe Lopes da Costa pela sua orientação e interesse demonstrado, quer no desenvolver do meu trabalho durante o estágio, quer na elaboração desta tese.

Às minhas colegas de laboratório, Eng.<sup>a</sup>. Patrícia Diniz e Dra. Ana Catarina Torres pelo seu apoio no decorrer dos trabalhos e pelo seu bom humor constante demonstrado quer nos momentos bons quer nos difíceis.

À Professora Doutora Luísa Mateus pela sua colaboração nas sessões de RIA necessárias para a elaboração desta tese, assim como pela partilha desinteressada do seu saber.

À Cristina Valado e todos os meus colegas e amigos do CIISA, pela sua boa disposição e espírito de entre-ajuda sempre bem vindos.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio financeiro prestado ao desenvolvimento dos trabalhos desta tese através do projecto “Interacções Embrio-Útero-Ovário determinando a sobrevivência embrionária e fetal em bovinos” (PTDC/CVT/65690/2006).

À minha família, nomeadamente aos meus pais e avó, a quem amo muito, e que ao longo da minha vida me têm sempre apoiado na conquista dos meus objectivos.



## RESUMO

### **Desenvolvimento de um sistema de cultura *in vitro* de células lúteas bovinas para estudar as interacções com embriões em co-cultura**

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de cultura *in vitro* de células lúteas bovinas, compatível com o sistema de cultura *in vitro* de embriões bovinos, para estudar as suas interacções, relevantes para o estabelecimento da gestação nos mamíferos. As células foram obtidas pela digestão de corpos lúteos (CL) pela collagenase, seguida de centrifugações em gradiente de Percoll® e centrifugações a velocidades decrescentes. Foram estudados os efeitos do estadio do CL do qual provêm as células lúteas, meio de cultura, concentração de soro no meio de cultura, tensão de oxigénio na atmosfera de cultura, criopreservação e cobertura da cultura com óleo mineral sobre a produção de progesterona ( $P_4$ ) pelas células lúteas em cultura. A  $P_4$  foi quantificada por radioimunoensaio. Verificou-se que o estadio do CL teve efeito significativo na  $P_4$  produzida, assim como a refrescagem do meio para as células provenientes do estadio *early*. Não se verificaram efeitos significativos dos restantes factores estudados. O óleo reduz cerca de 50× a  $P_4$  quantificada no meio. O sistema de cultura *in vitro* aqui desenvolvido apresenta as condições requeridas para a co-cultura de embriões.

**Palavras-chave:** células lúteas, cultura *in vitro*, embrião, co-cultura, progesterona, bovino



## ABSTRACT

### **Development of an *in vitro* culture system for bovine luteal cells which allow the study of embryo interactions in co-culture**

The objective of this work was to develop an *in vitro* culture system for bovine luteal cells, compatible with embryo *in vitro* culture systems, to allow the study of their interactions, which are relevant for the establishment of mammalian pregnancy. The cells were obtained by collagenase digestion of the corpus luteum (CL), followed by Percoll® gradient centrifuges and decreasing speed centrifuges. The effects of the stage of the CL of origin, culture medium, serum concentration in the culture medium, oxygen tension in the culture atmosphere, cryopreservation and mineral oil overlaying of the culture wells were evaluated on the luteal cells' ability to produce progesterone ( $P_4$ ).  $P_4$  was quantified by radioimmunoassay. From the above, the effects of the stage of the CL and of the refreshing of the culture medium in the cells of the early CL were significant. Oil overlaying reduced about 50× the  $P_4$  quantified in the medium. The luteal cell *in vitro* culture system here developed is able to support the required conditions for embryo co-culture sessions.

**Keywords:** luteal cells, *in vitro* culture, embryo, co-culture, progesterone, bovine





## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Índice geral .....	vii
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	viii
Índice de gráficos .....	viii
Lista de abreviaturas .....	x
I – Relatório de estágio .....	1
II – Introdução e Objectivos .....	2
1. Relevância e Justificação .....	2
2. Objectivos .....	2
III – Revisão bibliográfica .....	4
1. Corpo lúteo .....	5
2. Embrião .....	10
3. Cultura de células somáticas .....	11
4. Cultura de células lúteas <i>in vitro</i> .....	14
5. Cultura de embriões bovinos <i>in vitro</i> .....	16
IV – Materiais e Métodos .....	19
1. Obtenção de suspensões de células lúteas .....	19
2. Ensaio I .....	21
3. Ensaio II .....	22
4. Ensaio III .....	23
5. Ensaio IV .....	24
6. Doseamento de progesterona .....	25
7. Análise estatística .....	25
a) Geral .....	25
b) Ensaio I .....	26
c) Ensaio II .....	26
d) Ensaio III .....	26
e) Ensaio IV .....	27
V – Resultados .....	27
1. Ensaio I .....	27
2. Ensaio II .....	30
3. Ensaio III .....	34
4. Ensaio IV .....	35
VI – Discussão .....	36
VII – Conclusões .....	38
VIII – Bibliografia .....	40
IX – Anexo I .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação do padrão de secreção da FSH, $P_4$ e dos padrões de LH durante o ciclo éstrico na espécie bovina .....	5
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da produção de $P_4$ numa célula esteroidogénica .....	7
<b>Figura 3:</b> Ovários com corpos lúteos dos estadios <i>early</i> ou precoce, <i>mid</i> ou médio e <i>late</i> ou tardio do ciclo .....	20
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do protocolo de obtenção das suspensões de células lúteas bovinas .....	20
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática das placas de cultura utilizadas no ensaio I e das condições a que foram sujeitas .....	21
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática de uma placa de cultura do ensaio II .....	22
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática dos procedimentos de ensaio III .....	23
<b>Figura 8:</b> Esquema representativo de uma placa de cultura do ensaio IV .....	24

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características morfológicas usadas na classificação do CL nos bovinos ...	19
<b>Tabela 2:</b> Valores de $p$ para os efeitos fixos do teste de ANOVA factorial aplicados às concentrações de progesterona no meio de cultura .....	27
<b>Tabela 3:</b> Valores de $p$ obtidos do modelo estatístico pelo teste de ANOVA com medidas repetidas aplicado às concentrações de progesterona no meio de cultura ....	31

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) do efeito fixo estadio do CL sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio I) .....	28
<b>Gráfico 2:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) do efeito fixo meio de cultura sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio I) .....	28
<b>Gráfico 3:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) da interacção dos efeitos fixos estadio do CL×meio de cultura sobre a produção de progesterona pelas células lúteas em cultura (Ensaio I) .....	29
<b>Gráfico 4:</b> Efeito da refrescagem do meio de cultura sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio I) .....	30
<b>Gráfico 5:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) do efeito do estadio do CL sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio II) .....	31
<b>Gráfico 6:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) do efeito do meio de cultura sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio II) .....	32

<b>Gráfico 7:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) do efeito da concentração de soro no meio de cultura (5% ou 10%) sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio II) .....	32
<b>Gráfico 8:</b> Análise <i>post-hoc</i> (Fisher LSD) do efeito da tensão de oxigénio na atmosfera de cultura (5% ou 20%) sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio II) .....	32
<b>Gráfico 9:</b> Efeito da refrescagem do meio de cultura sobre a produção de $P_4$ por células lúteas em cultura (Ensaio II) .....	33
<b>Gráfico 10:</b> Efeito da congelação das células lúteas sobre a produção de $P_4$ às 0 horas (A) e às 48 horas (B) de cultura (Ensaio III) .....	34
<b>Gráfico 11:</b> Efeito da cobertura com óleo mineral na concentração de $P_4$ medida no meio de cultura após 5 dias de cultura (Ensaio IV) .....	35

## ABREVIATURAS

% - Percentagem

μL – microlitro

3β-HSD – 3β-hidroxisteroidesdesidrogenase

ANOVA – análise de variância

BAX – proteína X associada à Bcl-2

Bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - bomba de iões

BSA – albumina sérica bovina

cAMP – adenosina 3',5' - monofosfato cíclico

CL – corpo lúteo

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

DMEM-F12 – *Dulbecco's modified Eagle's medium* com *Hanks-F12*

DMSO – dimetil-sulfóxido

DNA – *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

E<sub>2</sub> – estradiol

EGF – *epidermal growth factor*, factor de crescimento epidermal

ET-1 – endotelina 1

Fas-L – ligando do Fas

FCS – *fetal calf serum*, soro fetal bovino

FGF – *fibroblast growth factor*, factor de crescimento fibroblástico

FSH – *follicle-stimulating hormone*, hormona folículo-estimulante

GH – *growth hormone*, hormona de crescimento

GnRH – *gonadotropin-releasing hormone*, hormona libertadora de gonadotrofinas

HDL – *high-density lipoprotein*, lipoproteína de alta densidade

HIF-1 – *hypoxia-inducible factor 1*, factor induzido pela hipóxia 1

I<sup>125</sup> – iodo de número atómico 125

ICM – *inner cell mass*, botão embrionário

FIV – fertilização *in vitro*

kg – quilograma

LDL – *low-density lipoprotein*, lipoproteína de baixa densidade

LDL-R – receptor de LDL

LH – *luteinizing hormone*, hormona luteinizante

mL – mililitro

mm<sup>3</sup> – milímetro cúbico

mRNA – *messenger ribonucleic acid*, ácido ribonucleico mensageiro

ng – nanograma

NO – óxido nítrico

$O_2$  – oxigénio  
 $^{\circ}C$  – grau Celsius  
 OT – oxitocina  
 P0 – cultura primária  
 P1 – primeira subcultura  
 P2 – segunda subcultura  
 P<sub>4</sub> – progesterona  
 PBR – *peripheral-type benzodiazepine receptor*, receptor periférico das benzodiazepinas  
 PBS – *phosphate buffered saline*, tampão fosfato salino  
 PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>  
 PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  – prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>   
 PGI<sub>2</sub> – prostaglandina I<sub>2</sub>  
 PKA – proteína quinase A  
 PKC – proteína quinase C  
 RIA – radioimunoensaio  
 RNA – *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico  
 RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute medium 1640*  
 SOCS – *superovulated cow serum*, soro de vaca super-ovulada  
 SOFaa – *synthetic ovidut fluid*, fluido oviductal sintético, com ácidos aminados  
 StAR – *steroidogenic acute regulatory protein*, proteína de regulação aguda esteróide  
 TCM-199 – *tissue culture medium -199*  
 TE – trofoectoderme  
 TNF $\alpha$  – *tumor necrosis factor  $\alpha$* , factor de necrose tumoral  $\alpha$   
 VEGF – *vascular endothelial growth factor*, factor de crescimento endotelial vascular



## I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado na Secção de Reprodução e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa, tendo como orientador o Professor Doutor Luís Lopes da Costa. Teve início no dia 1 de Fevereiro e terminou no dia 29 de Julho de 2011, tendo uma duração total de 6 meses. Após o período de estágio continuei na referida Secção, durante mais 5 meses, a desenvolver trabalho no âmbito do meu projecto de mestrado.

Durante o meu período de estágio participei activamente nos projectos em curso na Secção de Reprodução e Obstetrícia sob a orientação do Professor Doutor Luís Lopes da Costa, nomeadamente no projecto “Interacções Embrio-Útero-Ovário determinando a sobrevivência embrionária e fetal em bovinos” (PTDC/CVT/65690/2006), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, e no projecto “Lysophosphatidic acid (LPA) influence in the cellular and molecular mechanisms controlling embryo-maternal communication in cattle – an *in vitro* study” (DPN/DWM/MZ/5751/08/09), em colaboração com a Polish Academy of Science.

No âmbito destes projectos participei em todas as fases da preparação e realização de 29 sessões de produção de embriões bovinos *in vitro*, assim como na avaliação dos embriões daí resultantes, através de técnicas de imuno-citoquímica e contagem total de células. Participei ainda na realização de diversas sessões de radioimunoensaio levadas a cabo no Laboratório de Radioisótopos da FMV, com a orientação da Professora Doutora Luísa Mateus, para quantificação de progesterona, analisando não só os meios de cultura necessários para a elaboração desta tese mas também meios de cultura resultantes das sessões de produção de embriões.

As culturas de células lúteas bovinas utilizadas na elaboração desta tese foram levadas a cabo, quer durante o período de estágio oficial, quer nos meses subsequentes e foram possíveis graças à colaboração da Eng.<sup>a</sup> Patrícia Diniz e Dra. Ana Catarina Torres.



## II. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

### 1. Relevância e justificação

As interacções embrio-maternas nos mamíferos são complexas e de extrema relevância no estabelecimento da gestação. No entanto, o seu conhecimento é ainda muito fragmentário, apesar de se vislumbrar fulcral para a melhoria da eficiência da reprodução nas várias espécies de mamíferos.

Uma das abordagens a este estudo é o desenvolvimento de modelos *in vitro* que possibilitem observar o comportamento dos sistemas biológicos, ou a sua parte, em condições controladas. Tanto as condições para a manutenção de células somáticas do aparelho reprodutivo, como para o desenvolvimento de embriões pré-implantação *in vitro*, têm sido estudadas extensivamente nas últimas décadas e a partir destes estudos foi possível coleccionar informação que permitiu impulsionar o conhecimento nesta área.

No entanto, a informação passível de ser recolhida nestes sistemas simples é limitada. Assim, torna-se essencial a criação de modelos de co-cultura *in vitro* mais holísticos que permitam monitorizar e quantificar as influências mútuas entre elementos fulcrais do aparelho reprodutivo feminino, como o corpo lúteo, e o embrião precoce. A co-cultura destes elementos é contudo complexa, pois ambos têm necessidades de cultura diferentes e, por vezes, antagónicas. Em concreto, a cultura de células somáticas *in vitro* recorre a meios de cultura completos e complexos, incorporação de concentrações consideráveis de soro (10%) e tensões de O<sub>2</sub> elevadas (20%). Em contrapartida, a cultura de embriões *in vitro* recorre a meios de cultura simples, que mimetizem o fluido oviductal e uterino, a concentrações baixas de soro (até 5%) que não promovam alterações epigenéticas no embrião e a ambientes hipóxicos (5% O<sub>2</sub>) que reflectem a tensão de oxigénio normal no lúmen oviductal e uterino.

### 2. Objectivos

Assim, este trabalho teve como objectivo principal o desenvolvimento de um sistema de cultura *in vitro* de células lúteas bovinas compatível com o sistema de cultura *in vitro* de embriões bovinos. Adicionalmente, avaliou-se a possibilidade da cultura de células lúteas bovinas criopreservadas, para que células com a mesma origem possam ser utilizadas em várias sessões de co-cultura e com vários conjuntos de embriões, diminuindo assim a variabilidade entre ensaios. Foram efectuados quatro ensaios, cujos objectivos específicos se descrevem em seguida.

#### Ensaio I:

Foram avaliados os efeitos do estadio do corpo lúteo (CL) (*early versus mid versus late*), do tipo de meio de cultura (TCM-199 *versus* DMEM-F12 *versus* SOFaa) e da concentração de soro (5% *versus* 10%) no meio de cultura durante a fase de estabilização sobre a capacidade de produção de progesterona ( $P_4$ ) pelas células lúteas em cultura. Esta medida da funcionalidade das células lúteas (capacidade esteroidogénica) foi complementada com a avaliação da viabilidade das células em cultura (confluência e comportamento em cultura). Adicionalmente, foi avaliado o efeito da refrescagem do meio sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em 5 dias de cultura. Os meios de cultura comparados foram dois meios complexos utilizados na cultura de células somáticas (DMEM-F12 e TCM-199) e um meio desenvolvido para a cultura *in vitro* de embriões (SOFaa).

#### Ensaio II:

Foram avaliados os efeitos do estadio do CL (*early versus mid*), do meio de cultura (DMEM-F12 *versus* SOFaa), da concentração de soro (5% *versus* 10%) no meio de cultura e da tensão de oxigénio (5% *versus* 20%) da atmosfera de cultura sobre a capacidade de produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura. Adicionalmente, foi ainda avaliado o efeito da refrescagem diária do meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  em 5 dias de cultura. As concentrações de soro no meio de cultura e as tensões de oxigénio na atmosfera de cultura testadas reflectem as condições de cultura utilizadas na cultura *in vitro* de células somáticas e de embriões.

#### Ensaio III:

Foi avaliado o efeito da congelação sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura, após a sua descongelação.

#### Ensaio IV:

Foi avaliado o efeito da cobertura da cultura com óleo mineral sobre a quantificação da  $P_4$  no meio de cultura. Este ensaio foi realizado com o sistema cultural *in vitro* de células lúteas, desenvolvido nos ensaios anteriores, apropriado para a co-cultura com embriões.

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em Portugal, a produção leiteira constitui a maior fatia da produção agrícola, representando actualmente 28,1% da mesma (Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2007). A evolução neste sector tem sido tremenda e acompanha a tendência europeia para uma maior eficiência produtiva, com o melhoramento genético do efectivo conduzindo, segundo dados da ANABLE citados por Rocha *et al.* (2010), a um aumento de produção média de 6537 kg de leite numa lactação (305 dias) em 1996 para 8590 kg por lactação em 2002.

Uma boa eficiência reprodutiva é essencial para a rentabilidade de uma exploração leiteira e deve garantir-se que os parâmetros reprodutivos (intervalo entre partos, intervalo entre o parto e a inseminação fecundante e número de inseminações por concepção por exemplo) se mantenham a níveis compatíveis com os lucros mínimos que garantam a viabilidade da exploração. Apesar disto, ao longo dos anos, ao mesmo tempo que o efectivo leiteiro bovino europeu e americano tem vindo a aumentar a sua capacidade produtiva, tem-se vindo a verificar uma diminuição significativa da eficiência reprodutiva (Robinson, 2008; Rocha, 2010; Santos, 2004).

Vários estudos têm sido conduzidos de forma a identificar as causas deste fenómeno, assim como formas de poder contribuir para a sua reversão. Foram assim identificados vários factores que levam isoladamente ou em conjunto à ineficiência reprodutiva nos ruminantes, particularmente nos bovinos de aptidão leiteira, em que apenas 40% das inseminações resultam no nascimento de uma cria (Robinson, 2008).

De acordo com estes estudos, das perdas após a inseminação, apenas uma pequena parte se deve a falhas na concepção. Considerando uma boa de detecção de cios e uma técnica de inseminação correcta, a não fertilização do ócito justifica 5% das perdas e as anomalias cromossómicas graves e incompatíveis com a vida outros 5%. Registam-se ainda perdas embrionárias após a implantação (10-15%) mas a grande maioria das perdas, cerca de 35%, ocorre até ao 18º dia de gestação, no período pré-implantação, denominando-se de perdas embrionárias precoces (Santos, 2004). Estas últimas são essencialmente o resultado de uma comunicação deficiente entre o embrião e a mãe, resultando no não reconhecimento da gestação e na impossibilidade da continuação do desenvolvimento embrionário. Estas interacções são bastante complexas e delicadas e ainda pouco compreendidas pela comunidade científica. Sabe-se no entanto que as perdas embrionárias precoces são tão mais frequentes quanto maior a produção leiteira da fêmea e mais frequentes em vacas em produção do que em novilhas. De facto, o balanço energético negativo a que vacas de alta produção estão sujeitas parece diminuir a *performance* reprodutiva a médio e longo prazo

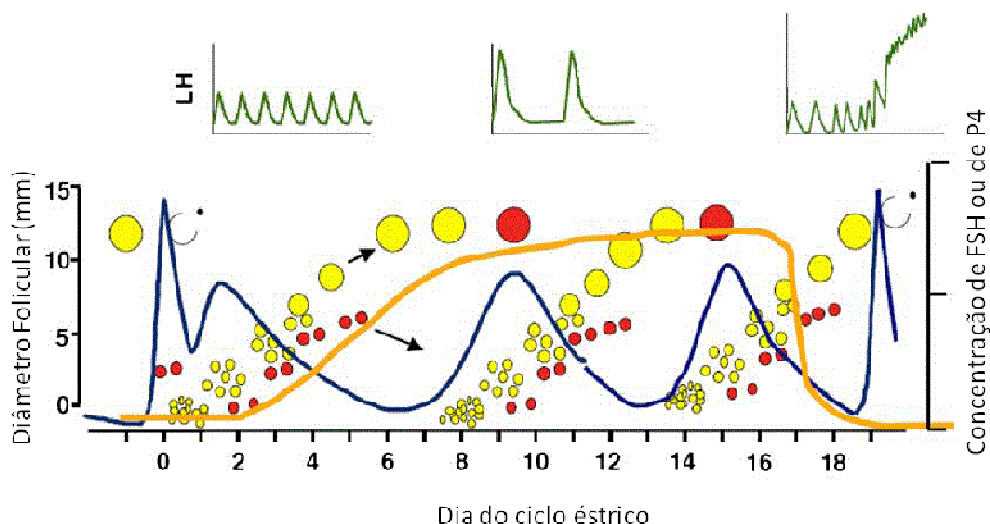
por induzir ambientes foliculares adversos que originam uma preparação incorrecta do oócito ovulatório e corpos lúteos disfuncionais que condicionam a função uterina (Diskin, 2008).

Seguidamente, serão focados os dois elementos da comunicação embrio-materna que são o alvo deste trabalho: o corpo lúteo e o embrião.

## 1. Corpo Lúteo

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária cuja função primordial é a produção de progesterona ( $P_4$ ), hormona essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação na espécie bovina.

**Figura 1:** Representação do padrão de secreção da FSH (azul),  $P_4$  (amarelo) e dos padrões de LH (verde) durante o ciclo éstrico na espécie bovina. Os círculos representam o padrão de crescimento folicular: os círculos amarelos representam os folículos em crescimento e os vermelhos os folículos atresícos. O dia 0 é o dia da ovulação e início da formação do corpo lúteo. Os padrões de secreção de LH representados mostram períodos de 8 horas típicos do início (primeiro gráfico) e fase intermédia (segundo gráfico) da fase lútea e da fase folicular (terceiro gráfico). Adaptado de Forde *et al.* (2011).



Na fase folicular do ciclo éstrico (Figura 1), o folículo dominante pré-ovulatório torna-se cada vez mais sensível à LH (hormona luteinizante) devido ao aumento da quantidade de receptores para esta hormona, e produz quantidades crescentes de estradiol ( $E_2$ ). O aumento de  $E_2$ , conjuntamente com as concentrações basais de  $P_4$  em circulação, promove o aumento da secreção de GnRH (hormona libertadora de gonadotrofina) pelo hipotálamo. Esta, por sua vez, regula a actividade da hipófise anterior, estimulando a libertação de FSH (hormona foliculo-estimulante), e modelando o padrão pulsátil de secreção de LH. Visto

nesta fase as concentrações séricas de  $P_4$  serem mínimas, a secreção pulsátil de LH pela hipófise tem baixa amplitude e alta frequência, o que leva a um pico da sua secreção, com a consequente ovulação do folículo dominante (Forde, 2011).

O CL forma-se a partir do folículo colapsado após a ovulação. As células da teca interna e da granulosa, sob a influência da LH, reorganizam-se ocupando o espaço antral do folículo e completam o processo de luteinização iniciado antes da ovulação, tornando-se células esteroidogénicas. Assim, na fase inicial do CL, denominado corpo hemorrágico, a membrana basal entre a teca interna e a granulosa desintegra-se e vasos sanguíneos começam a invadir o espaço antral folicular, desenvolvendo uma extensa rede vascular (Niswender, 1994). Observa-se ainda um grande aumento da actividade mitótica das células da teca interna (que darão origem às chamadas células lúteas pequenas) que se distribuem à volta das células da granulosa (futuras células lúteas grandes) nas quais a multiplicação não é tão significativa. Ainda após a ovulação verifica-se nestas células um aumento da transcrição dos genes codificantes para moléculas essenciais na síntese de  $P_4$  nomeadamente o citocromo P450<sub>scc</sub>, a  $3\beta$ -HSD, receptores de LDL (LDL-R) (Niswender, 1994) e a StAR (Juengel, 1999). Nesta fase precoce, cada célula lútea apresenta já a capacidade máxima de produção de  $P_4$  (Reynolds, 1999).

O CL apresenta um crescimento muito rápido na sua fase inicial, apenas comparável a alguns tumores. Na fase média do ciclo éstrico bovino, entre o 6º e o 9º dia, o CL cresce até atingir o seu tamanho máximo (Ireland, 1980) e o seu número máximo de células esteroidogénicas, sendo também nesta altura atingido o máximo da produção de  $P_4$  da glândula. O aumento do tamanho do CL deve-se não só ao aumento do número das células lúteas pequenas e ao crescimento das células lúteas grandes que formam cerca de 80% da sua massa, mas também ao aumento da vascularização e enorme aporte sanguíneo (Niswender, 1994). De facto, para suportar esta taxa de crescimento extremamente rápida e também as elevadas taxas metabólica e de renovação celular e ainda a constante produção de esteróides, para além de outras hormonas, desenvolve-se uma complexa rede vascular que permite que quase todas as células estejam em contacto com pelo menos um vaso sanguíneo. Estudos recentes revelaram que na fase inicial da formação do CL, a hipóxia que as células lúteas sofrem inicialmente leva à produção de factores angiogénicos como HIF1 e VEGF, que são essenciais ao desenvolvimento de uma vasculatura madura que possibilite o estabelecimento de um corpo lúteo perfeitamente funcional. Este mecanismo parece ser conservado em várias espécies de mamíferos para além da espécie bovina (Nishimura, 2010).

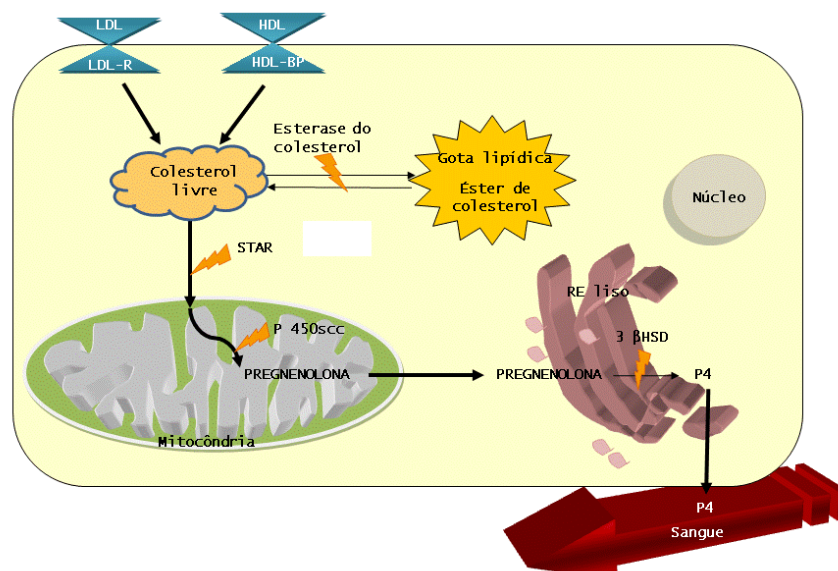
A  $P_4$  produzida pelo CL é essencial para a manutenção da gestação em todos os ruminantes domésticos e produções abaixo do nível óptimo são a principal causa de perda embrionária

precoce (Juengel, 1999). De facto, vários estudos indicam que uma menor concentração de  $P_4$ , quer primária, quer por maior *clearance* hepática, resulta numa menor taxa de sobrevivência embrionária (Skarzynski, 2008). Este fenómeno pode ter como causa uma menor secreção uterina de proteínas e outros factores de crescimento (Garrett, 1988) que se pensa serem essenciais para a manutenção da saúde embrionária e subsequente produção de níveis óptimos de interferon-tau, factor essencial ao reconhecimento materno da gestação (Kerbler, 1997). Existem ainda evidências de que fracas concentrações de  $P_4$  no ciclo imediatamente anterior ao usado para a inseminação levam a um aumento de perdas embrionárias, possivelmente devido à maturação prematura do oócito ovulado e consequente falha no desenvolvimento após a fertilização (Diskin, 2008).

Após a implantação, a  $P_4$  promove o relaxamento do músculo liso uterino, o crescimento e secreção do endométrio e influencia o metabolismo materno e o desenvolvimento mamário (Reynolds, 1999). Esta hormona esteróide é ainda um interveniente importante na regulação do ciclo éstrico, uma vez que, durante a fase lútea, inibe a secreção de gonadotrofinas pituitárias, impedindo a ovulação dos folículos dominantes que se desenvolvem durante este período (Forde, 2011).

O processo de biossíntese da  $P_4$  a partir do colesterol é complexo e envolve várias etapas em vários organitos celulares (Figura 2).

**Figura 2:** Representação esquemática da produção de  $P_4$  numa célula esteroidogénica.



O colesterol, fornecido à célula na forma de HDL ou LDL, liga-se aos seus receptores na membrana e é internalizado. Uma vez no citoplasma, a sua maioria é imediatamente utilizada na cascata de produção de  $P_4$ . O restante é armazenado em gotas lipídicas na forma de ésteres de colesterol, sendo disponibilizado em alturas de escassez mediante a

acção da esterase do colesterol. O transporte da molécula de colesterol dentro da célula até à mitocôndria é assegurado pelo citoesqueleto. Do citoplasma, o colesterol passa para a membrana da mitocôndria através da acção da StAR (*steroid acute regulatory protein*) e liga-se depois à PBR (*peripheral-type benzodiazepine receptor*) que actua como transportador para a membrana interior da mitocôndria (Niswender, 2002). Este é o passo limitante da reacção (Rekawiecki, 2008), regulando a maior ou menor produção de hormona na célula e o principal alvo das acções reguladoras. Uma vez na membrana interior da mitocôndria, o colesterol é convertido em pregnenolona pelo complexo de enzimas de clivagem da cadeia lateral composto pelo citocromo P450<sub>scc</sub>, adrenodoxina e reductase de adrenodoxina. A pregnenolona é transportada para fora da mitocôndria e depois para o retículo endoplasmático liso, onde é desidrogenada pela enzima 3 $\beta$ -HSD dando origem à P<sub>4</sub> que é finalmente excretada da célula por difusão (Juengel, 1999).

Existem vários factores que regulam o crescimento e a produção de P<sub>4</sub> pelo CL, afectando diferentemente células lúteas grandes e pequenas, que são distintas morfológica e bioquimicamente. A grande maioria da P<sub>4</sub> (mais de 85%) é produzida pelas células lúteas grandes e a sua produção parece ser constitutiva, uma vez que este tipo de células não reage de forma tão exuberante a estímulos como as células lúteas pequenas (Niswender, 2002). A LH tem um papel crítico na esteroidogénese do CL, regulando-a de forma imediata e influenciando-a a longo prazo. Efectivamente, esta hormona é essencial para a manutenção de níveis normais de mRNA para a 3 $\beta$ -HSD, citocromo P450<sub>scc</sub> e StAR (Niswender, 2002) nas células esteroidogénicas e à medida que o CL se desenvolve e atinge a fase média do ciclo, o número dos seus receptores aumenta (Rekawiecki, 2008), assim como a sensibilidade individual de cada célula à sua activação (Juengel, 1999), diminuindo posteriormente na fase final do ciclo. Nas células lúteas pequenas a estimulação com LH leva a um aumento da produção de P<sub>4</sub> (até 40 vezes mais), enquanto nas células lúteas grandes, apesar de existirem receptores para esta hormona, verifica-se uma estimulação ténue ou nula (Niswender, 1994). Pensa-se que a LH actua através da activação da proteína quinase A (PKA) quando se liga ao seu receptor na célula, através de uma reacção dependente da cAMP (Rekawiecki, 2005). A PKA é responsável pelo aumento da transcrição da StAR em humanos, ratos e ovelhas, assim como o aumento da sua actividade (Juengel, 1999) e da actividade da PBR (Niswender, 2002). A LH é ainda capaz de promover o aumento das concentrações de mRNA para a proteína StAR, 3 $\beta$ -HSD e citocromo P450<sub>scc</sub> e os seus produtos em células lúteas bovinas em cultura (Rekawiecki, 2005).

O CL é ainda sensível à estimulação com outros factores, tais como as prostaglandinas (PG) – PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> e a hormona de crescimento (GH), entre outras (Juengel, 1999). A PGE<sub>2</sub> é produzida por vários tecidos, nomeadamente pelo endométrio durante todo o ciclo

éstrico (Woclawek-Potocka, 2009) e durante a gestação (Asselin, 1997), pelo embrião (Meier, 2009; Saint-Dizier, 2011), e ainda pelo próprio CL. Estudos *in vitro* indicam que esta hormona actua utilizando o mesmo mecanismo da LH e promove as mesmas alterações nas células lúteas (Rekawiecki, 2005), para além de aumentar o aporte sanguíneo a esta glândula (Weems, 2006).

Por sua vez, a  $P_4$  também influencia positivamente a sua própria produção, aumentando os níveis de StAR,  $3\beta$ -HSD e citocromo P450scc e a actividade da  $3\beta$ -HDS desde o 6º até ao 16º dia do ciclo (Skarzynski, 2008). A  $P_4$  é também importante para a manutenção do CL, suprimindo a apoptose mediada pela Fas-L, através da diminuição da expressão do mRNA da Fas, assim como da diminuição da expressão do mRNA da caspase 3 e da diminuição da sua activação (Skarzynski, 2008).

Para além da produção de  $P_4$ , as células do CL estão também envolvidas na produção de outras hormonas importantes na regulação do ciclo reprodutivo na fêmea bovina, tais como prostaglandinas ( $PGE_2$ ,  $PGI_2$  e  $PGF_{2\alpha}$ ), oxitocina (OT) e factores de crescimento angiogénico (VEGF, EGF e FGF) (Skarzynski, 2008). É importante salientar que a partir da fase média do ciclo o CL tem uma estimulação autócrina, aumentando a produção de  $P_4$  e  $PGE_2$ , que influenciam o aumento da produção destas mesmas hormonas, formando um *loop* de *feedback* positivo (Rekawiecki, 2008).

Ao 16º dia do ciclo, se não houver reconhecimento materno da gestação pela ausência ou insuficiência de interferon-tau, o útero começa a produzir  $PGF_{2\alpha}$  que é transportada directamente e sem metabolização para o CL através do sistema de contra-corrente que liga a veia uterina à artéria ovárica (Forde, 2011). Esta hormona é o principal agente luteolítico nos ruminantes domésticos e dá início a uma série de processos que levam à regressão completa do CL ou luteólise. A luteólise pode ser dividida em duas fases distintas: a luteólise funcional, que é mais imediata e consiste na diminuição abrupta da produção de  $P_4$ , necessária para a retoma da ciclicidade normal, e a luteólise estrutural, que consiste num processo mais longo e que envolve a diminuição de tamanho do CL até ao seu desaparecimento de forma a manter o tamanho do ovário ao longo da vida do animal (Meidan, 1999).

As células lúteas expressam receptores para a  $PGF_{2\alpha}$  a partir do 5º dia do ciclo e a sua activação, fisiologicamente ao 16º dia do ciclo ou por administração exógena antes desse período, promove um aumento do cálcio livre intracelular que leva à morte da célula (Niswender, 2002). A  $PGF_{2\alpha}$  também está envolvida na diminuição da produção de  $P_4$  por activação da via PKC, que diminui a disponibilidade de cAMP necessário para a via de estimulação da StAR (Niswender, 2002), e pela diminuição da transcrição do mRNA da  $3\beta$ -



HSD e da StAR (Junegel, 1999), assim como dos receptores de LH e LDL (Niswender, 2002).

Adicionalmente, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  actua sobre as células endoteliais do CL promovendo a produção de endotelina 1 (ET-1) que actua nas células lúteas diminuindo a sua produção de  $\text{P}_4$ , promovendo vaso-constricção com consequente hipóxia e recrutando leucócitos que se infiltram no tecido lúteo e produzem a citocina  $\text{TNF}\alpha$  (Meidan, 1999) que, entre outras, aumenta a produção de óxido nítrico (NO) já estimulada directamente pela  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Lee, 2009). O NO, nas células da fase final do ciclo, promove a apoptose por activação da expressão e aumento da actividade da caspase 3 e Bax (Skarzynski, 2008).

A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  estimula ainda a sua própria produção pois o seu aumento promove a libertação de OT pelas células lúteas, que aumenta a produção uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por activação dos receptores de OT presentes no endométrio a partir do 17º dia do ciclo éstrico (Mann, 1999).

## 2. Embrião

Nos ruminantes domésticos, incluindo os bovinos, na fase folicular do ciclo éstrico dá-se a ovulação do folículo dominante após o pico de LH, com a consequente expulsão do oócito nele contido. *In vivo*, o pico de LH funciona também como sinal para que se reinicie o processo de meiose do oócito, de forma a que este atinja a metáfase II, podendo deste modo ser fertilizado. É também na fase da maturação que ocorrem alterações a nível do citoplasma e da superfície celular do oócito essenciais à formação de um embrião competente. Estes fenómenos ocorrem no oviducto da fêmea, local que é também responsável pelo transporte do sémen e que proporciona aos espermatozóides o ambiente certo para serem capacitados. Este último processo consiste numa série de transformações, nomeadamente ao nível do acrossoma, que os torna capazes de fertilizar o oócito. É ainda no oviducto que o zigoto contacta com o primeiro histotrofo. Este último é constituído por proteínas, glicoproteínas, lípidos e outras substâncias que garantem a nutrição inicial do embrião e ainda factores de crescimento que regulam o desenvolvimento do mesmo.

Na espécie bovina, a primeira divisão celular, ou clivagem, ocorre às 30 horas e a segunda nas 10 a 12 horas seguintes. As células embrionárias, denominadas blastómeros, continuam a sua divisão até à fase de 8-16 células, por volta do 5º dia após o estro, altura em que o embrião deixa de ser dependente dos mRNA maternos armazenados no citoplasma aquando da maturação do oócito, e passa a expressar o seu próprio transcriptoma. Esta é uma das fases mais críticas do desenvolvimento embrionário e erros nesta altura podem conduzir à morte do embrião. Neste estadio, o embrião tem um metabolismo oxidativo muito

baixo, utilizando como fonte de energia principal o piruvato, o lactato ou ácidos aminados em vez da glucose que, nesta fase, lhe pode ser prejudicial (Gardner, 1999).

Em condições normais o embrião bovino, ao atingir o estadio de mórula, com 32 células ou mais, por volta do 6º dia após o estro, começa a sofrer compactação. Neste processo, as células mais externas da mórula formam entre si *tight junctions* e começam a transportar iões para dentro do aglomerado de blastómeros através da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , promovendo a entrada de água para o seu interior por osmose. A partir desta fase ocorre a primeira diferenciação celular, formando-se uma cavidade, ou blastocelo, tomando então o embrião a designação de blastocisto. Este é composto na sua camada mais externa pela trofoectoderme (TE), que dará origem à placenta e às membranas extra-embrionárias, e pelo botão embrionário (ICM, do inglês *inner cell mass*), que dará origem ao feto. É no estadio de mórula compacta ou jovem blastocisto que o embrião entra no útero, onde continuará o seu desenvolvimento (Gordon, 1994). Após a compactação, o metabolismo embrionário é completamente distinto do observado na fase inicial de desenvolvimento e permite a utilização de glucose como fonte energética (Gardner, 1999). O desenvolvimento embrionário continua com a expansão do blastocisto até à sua eclosão entre o 9º e o 11º dia após o estro. Posteriormente dá-se o alongamento do blastocisto, aderência e depois a implantação no útero, com formação da placenta.

### **3. Cultura de células somáticas**

A cultura de células somáticas *in vitro* é uma ferramenta essencial para estudar o modo como as células se comportam face a estímulos determinados, sem obter resultados falseados pela presença das restantes células do mesmo órgão ou de outros órgãos. Assim, desde o início do século XX têm sido desenvolvidos métodos que permitem a criação de sistemas de cultura que mantenham uma população celular pura ou mista, derivada de um ou mais tecidos ou órgãos de um animal.

Existem vários tipos de cultura de tecidos, podendo estes ser divididos em três tipos principais: cultura de órgãos (utiliza o órgão inteiro ou pedaços do órgão, mantendo a sua arquitectura original), cultura de explantes (fragmentos de tecido) e cultura celular (células individualizadas) (Freshney, 2005). Pela facilidade de execução e maior economia, as duas últimas modalidades são as mais utilizadas, fornecendo resultados bastante satisfatórios. No entanto, a escolha de cada tipo de cultura deve ter em atenção o órgão ou tecido a estudar, o tipo das células necessárias (células de tecidos adultos, embrionários, tumorais ou outros) e em última análise, o objectivo do estudo (Masters, 2000).

A obtenção de explantes é relativamente simples, sendo necessário o corte de um fragmento de tecido ou órgão com reduzidas dimensões (normalmente até cerca de 1mm<sup>3</sup>). Este tipo de cultura permite manter alguma da arquitectura tissular original e a população celular é necessariamente mista e em proporção representativa do tecido de origem. No entanto, estas células não podem ser propagadas, cada fragmento é muito difícil de reproduzir em termos de dimensões e massa exactas e são necessários novos explantes para cada novo ensaio, o que reduz em grande parte a reprodutibilidade. A obtenção de culturas celulares permite uma melhor caracterização e quantificação das células obtidas, assim como a utilização de vários grupos homogéneos a partir de uma mesma amostra. No entanto, as interacções inter-células e entre as células e a matriz extra-celular são perdidas. Estas culturas são criadas a partir da dissociação das células de um determinado tecido através de métodos mecânicos ou, mais frequentemente, através de métodos enzimáticos. Estes últimos consistem na digestão de pequenos fragmentos de tecido com soluções simples ou combinadas de colagenase, tripsina, elastase, pronase, dispase, DNase ou hialuronidase. As células individualizadas e em suspensão são então colocadas num suporte físico e em contacto com meio de cultura de forma a poderem aderir, formando monocamadas, e multiplicar-se (Freshney, 2005).

As culturas celulares permitem ainda trabalhar não só com populações heterogéneas de células, tal como são encontradas em qualquer tecido de mamíferos, mas também com populações enriquecidas num determinado tipo celular, podendo mesmo atingir graus elevados de pureza. Para este efeito são necessários, para além da dissociação das células, procedimentos que permitam a sua separação física. As técnicas de separação baseiam-se numa característica de cada tipo celular ou nas suas combinações, tal como a densidade, afinidade dos epítomos da superfície celular para anticorpos, tamanho e capacidade de dispersão da luz ou emissão de fluorescência. As técnicas mais comuns e económicas baseiam-se nas duas primeiras, necessitando as outras de aparelhos mais sofisticados mas que, de um modo geral, permitem obter um maior grau de pureza na suspensão celular resultante (Freshney, 2005).

À cultura de células obtidas directamente a partir de um tecido chama-se cultura primária. Esta tem normalmente uma composição heterogénea e uma baixa fracção de crescimento, ou seja, tem uma menor percentagem de células em divisão. Apesar disso, a cultura primária é a mais representativa das células do tecido original e a que tem maior potencial para expressar as características específicas do mesmo (Masters, 2000). Quando esta cresce de forma a ocupar todo o espaço de cultura (ou substrato) disponível torna-se necessário fazer uma passagem da cultura que envolve, nas culturas aderentes, a dissociação da monocamada (ou tapete celular) de forma a obter novamente células isoladas e a sua transferência para um novo substrato com novo meio de cultura. Uma vez

passada, a subcultura da cultura primária passa a denominar-se de linha celular. Este novo conjunto de células é composto por várias linhagens celulares com maior uniformidade entre si, com uma fracção de crescimento mais elevada e que podem, ou não, continuar a expressar as características fenotípicas da população inicial (Freshney, 2005; Masters, 2000). A necessidade de realizar subculturas de culturas primárias prende-se com vários factores, sendo o mais relevante a necessidade de obter populações celulares em quantidade e uniformidade suficiente, que possam ser preservadas e utilizadas ao longo de períodos de tempo indefinidos (Masters, 2000).

A realização de passagens sucessivas de uma cultura primária apenas para manutenção da população sem que sejam necessárias para os trabalhos a decorrer no laboratório num dado momento está associada a custos elevados. Para além disso, as várias subculturas induzem alterações à população original, nomeadamente pela deriva genética associada à instabilidade genética de células em cultura, variação fenotípica pela selecção sucessiva de linhas celulares mais indiferenciadas, senescência da população e transformação das suas características de crescimento (Freshney, 2005). A realização de uma passagem por criopreservação é a melhor forma de colmatar a necessidade de utilização das células em alturas distintas da cultura primária e utilizar a mesma população em várias situações de cultura impraticáveis no mesmo espaço temporal. De forma a conseguir uma boa percentagem de células viáveis após a descongelação é necessário minimizar a formação de cristais de gelo intracelulares e reduzir os danos provocados pela concentração de solutos que se dá aquando da congelação da água intracelular. Assim, é indispensável a utilização de meios de congelação com substâncias crioprotectoras como o glicerol ou o dimetil-sulfóxido (DMSO). Este último tem uma maior penetração na célula, tornando-se mais eficaz e é por isso o mais frequentemente utilizado nas células onde a sua toxicidade é negligenciável (Freshney, 2005). As células podem ser armazenadas desta forma a temperaturas de  $-75^{\circ}\text{C}$  durante curtos períodos de tempo ou, preferencialmente em azoto líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ou vapores de azoto ( $-135^{\circ}\text{C}$ ) que permitem um armazenamento durante períodos praticamente infinitos sem perda de viabilidade (Masters, 2000).

Na cultura primária ou nas suas subculturas é importante avaliar as células obtidas de forma a perceber se estas são adequadas quanto à sua viabilidade e função. Os testes de viabilidade são usados para avaliar a proporção de células viáveis a seguir a eventos potencialmente lesivos, tais como a dissociação do tecido para o estabelecimento da cultura primária, a criopreservação ou contacto com substâncias potencialmente lesivas como as enzimas utilizadas na dissociação celular (Freshney, 2005). A maioria destes testes tem como base o princípio de que apenas as células viáveis mantêm a integridade de membrana. Utilizam-se assim corantes que não são internalizados numa célula viável, tais como o Azul Tripano (utilizado mais frequentemente), a Eritrosina ou corantes que apenas

são internalizados e retidos nas células saudáveis, tal como o Vermelho Neutro. Estes testes são imediatos e basta observar uma pequena alíquota da suspensão com o auxílio de um microscópio óptico para determinar a percentagem de células coradas. Outros testes de viabilidade e proliferação celular baseiam-se na actividade metabólica inerente às células vivas mas inexistente em células mortas ou não viáveis. Neste tipo de testes medem-se parâmetros tais como a síntese de DNA, RNA, proteínas ou a capacidade de metabolização de substâncias. No entanto, aplicam-se principalmente a células que sofrem o insulto (ou estímulo) em cultura e realizam-se como *end-point* da experiência. Os ensaios de proliferação mais utilizados baseiam-se na metabolização do MTT, um corante amarelo hidrossolúvel que, ao ser reduzido pela célula, se transforma num composto roxo insolúvel em meio aquoso. Após um período de incubação das células com esta substância é possível medir com um espectrofotómetro a intensidade da cor roxa e esta é directamente proporcional à quantidade de células metabolicamente activas presentes (Freshney, 2005).

A função das células em cultura pode ser facilmente avaliada no caso de células secretoras pela medição dos metabolitos ou produtos de secreção no meio de cultura. São ainda possíveis testes à mobilidade celular utilizando ensaios de migração celular, muito utilizados em células de origem tumoral ou do sistema imunitário, ensaios à capacidade de polarização celular e ensaios de estratificação. Estes últimos são utilizados, por exemplo, em células da tiróide, intestino ou da epiderme, entre outros (Freshney, 2005).

#### **4. Cultura de células lúteas *in vitro***

Como já foi referido, o CL é uma estrutura fulcral para o estabelecimento e manutenção da gestação em todos os mamíferos e o seu estudo de grande importância para compreender os fenómenos do ciclo reprodutivo e a sua regulação. No entanto, o seu estudo *in vivo* revela alguns problemas devido à sua regulação complexa e à grande quantidade de funções autócrinas e parácrinas que não se reflectem necessariamente em variações significativas dos perfis bioquímicos séricos. Desta forma, para caracterizar a resposta das células lúteas a vários estímulos e a sua interacção com outras células relevantes, torna-se necessário desenvolver métodos que permitam a manutenção das células lúteas em cultura, mantendo a sua viabilidade e funcionalidade intactas.

Ao longo dos anos têm sido publicados vários trabalhos por equipas de investigadores de todo o mundo que utilizam culturas de células lúteas de várias espécies. Os métodos de cultura variam ligeiramente entre laboratórios e dependem de cada ensaio específico, nomeadamente do tempo de cultura, do tipo de células a estudar (células lúteas grandes, células lúteas pequenas, células endoteliais, células do estroma ou outras isoladamente ou

em combinações), e dos parâmetros a avaliar (transcriptoma, produção hormonal, viabilidade, entre outros).

Vários autores utilizam explantes de CL para os seus ensaios, devido à facilidade e economia da sua obtenção (Buhi, 1997; Ferreira-Dias, 2011; Yang, 2010). No entanto, a cultura celular obtida a partir da dissociação enzimática do tecido lúteo parece ser o método mais frequentemente utilizado pelos vários autores por permitir ensaios de curta (Grazul-Bilska, 1996; Thibodeaux, 1994) e longa duração (Arikan, 2000; Fridén, 1999) assim como uma melhor quantificação do número de células a usar.

Também nos métodos de isolamento das células lúteas, no caso das culturas celulares, existe uma grande variedade de métodos disponíveis. Assim, podemos encontrar na literatura ensaios com populações de células heterogéneas produzidas com a simples digestão enzimática do tecido, que podem conter, não só células esteroidogénicas, mas também células endoteliais ou outras em quantidades variáveis (Arikan, 2000; Grazul-Bilska, 1996; May, 2011). Alternativamente, são ainda utilizadas populações celulares obtidas a partir da separação dos vários tipos de células utilizando várias técnicas como a centrifugação em gradientes de Percoll® que separa as células pela sua densidade (Fridén, 1999), a citometria de fluxo que utiliza a dispersão de luz (Del Vecchio, 1994), a adesão a esferas magnéticas cobertas com anti-corpos para antígenos da superfície celular (Acosta, 2007; Kohen, 1998), entre outros.

Visto o CL ser uma estrutura altamente irrigada e com actividade esteroidogénica intensa, torna-se evidente a necessidade de utilização de meios de cultura complexos (como o DMEM-F12 ou o RPMI 1640) suplementados com 5 ou 10% de soro e eventualmente BSA (albumina sérica bovina) para que as células não tenham limitações nutricionais e possam responder correctamente aos estímulos experimentais. De facto, há evidência na literatura de que estas células sofrem processos degenerativos e apoptóticos na ausência de soro (Goyeneche, 2006) e sabe-se que a esteroidogénese depende essencialmente do aporte imediato de colesterol à célula e não da sua libertação das reservas de acetato de colesterol do citoplasma, que são insuficientes (Carroll, 1992). O grande aporte sanguíneo ao CL *in vivo* deixa ainda prever que as células lúteas toleram tensões de oxigénio elevadas, havendo mesmo estudos que indicam que estas, em condições hipóxicas (3% O<sub>2</sub>), produzem menos P<sub>4</sub> e entram em apoptose (Nishimura, 2008).

É ainda importante referir que a esmagadora maioria dos estudos referidos utilizam culturas primárias. Existe uma linha celular de células lúteas de rato transformadas, perfeitamente caracterizada, que tem sido utilizada em alguns estudos (Goyeneche, 2006). No entanto, esta linha celular é desprovida de receptores essenciais à resposta a vários estímulos luteotróficos, como a LH ou P<sub>4</sub> e ainda de enzimas essenciais à produção de P<sub>4</sub> (Sugino,

1998), pelo que as suas respostas às condições de ensaio podem não ser representativas de acontecimentos *in vivo*. O estudo do comportamento de células lúteas com um número limitado de passagens ou sujeitas à criopreservação é actualmente limitado. No entanto, este revela-se necessário, pois a reacção de cada tipo de tecido à cultura, quer primária, quer às subsequentes passagens, é única e deve sempre ser verificada de forma a validar os resultados obtidos a partir da mesma.

## **5. Cultura de embriões bovinos *in vitro***

A produção de embriões *in vitro* começou a ser pensada e tentada desde o século XIX com o objectivo de estudar e compreender os fenómenos associados à embriogénese. No entanto, só em 1981 nasceu o primeiro bezerro resultante de fertilização *in vitro* (FIV), nos Estados Unidos da América, como resultado dos trabalhos de Brackett e colaboradores (1982). Desde essa data a FIV continua a ser utilizada como ferramenta essencial para compreender os vários fenómenos reprodutivos e os processos complexos que envolvem a formação de embriões em várias espécies animais. Com a possibilidade da massificação de produção de embriões *in vitro*, é ainda válido pensar nestes processos como forma de aumentar a eficácia reprodutiva em espécies de interesse económico, intensificando a sua pressão de selecção ou mesmo como ferramenta de reprodução assistida em espécies ou raças com pouco efectivo e em perigo de extinção (Gordon, 1994).

O processo de FIV é no entanto complexo, pois a mimetização das condições do ambiente do aparelho reprodutor materno é sempre difícil, devido à grande falta de informação detalhada sobre o mesmo. Ao longo dos anos têm sido feitos esforços no sentido de encontrar o melhor meio ou conjuntos de meios e suplementos que permitam uma produção mais eficaz de embriões de várias espécies. Apesar disso, o sistema ideal ainda não foi descoberto e os embriões produzidos *in vitro* têm tendência para apresentar anomalias no seu transcriptoma e metabolismo que ultrapassam a grande capacidade adaptativa do embrião e são responsáveis pelo seu atraso no desenvolvimento e mesmo a sua inviabilização total (Gardner, 1999). Contudo, são já conhecidos alguns requisitos essenciais à obtenção de boas taxas de desenvolvimento, com a produção de embriões viáveis e capazes de continuar a sua evolução a seguir à sua transferência para uma fêmea receptora. Refere-se em seguida os que se apresentam relevantes para este trabalho.

Todos os mamíferos são homeotérmicos ou endotérmicos e como tal, têm a capacidade de manter a sua temperatura corporal constante. Sabe-se que o oviducto tem uma temperatura que oscila ligeira e fisiologicamente ao longo do ciclo éstrico e que todos os processos celulares e maquinaria enzimática das células do oviducto, espermatozóides e embriões

está adaptada para essa temperatura específica, e os bovinos não são exceção (Hunter, 2009). Assim sendo, os embriões necessitam de uma temperatura constante e suportam apenas pequenas variações térmicas sem que o seu desenvolvimento seja comprometido. Tradicionalmente conseguem-se taxas de blastocistos superiores com temperaturas que variam entre 38,5 e 39°C, verificando-se que os embriões sofrem atrasos de desenvolvimento com temperaturas mais baixas e morrem a temperaturas superiores a 40°C (Gordon, 1994).

Estudos feitos em várias espécies indicam que a tensão de oxigénio é mais baixa no lúmen do oviducto e no útero. Sabe-se ainda que uma elevada tensão de oxigénio está associada a um nível elevado de radicais de oxigénio livres para os quais os embriões têm pouca tolerância na fase da pré-implantação, sofrendo de alterações na conformação das suas proteínas e na actividade celular após exposição prolongada. Assim, e através de vários estudos com cultura de embriões sem a presença de células somáticas, verificou-se que o ideal para minimizar a apoptose e conseguir uma boa taxa de desenvolvimento é uma atmosfera com 5% de oxigénio (Yuan, 2003).

O próprio meio que envolve os embriões tem sido alvo de grande parte da pesquisa realizada na área da produção de embriões *in vitro*. Uma vez que é este que fornece ao embrião os nutrientes necessários para suportar o seu funcionamento normal e a multiplicação das suas células, idealmente, este deve mimetizar o histotrofo produzido pelas células do oviducto e útero. Tervit, em 1972, desenvolveu um meio sintético de cultura de embriões baseado na composição bioquímica do fluido oviductal de ovinos, denominado SOF (*synthetic oviductal fluid*). Desde essa altura este meio tem vindo a ser melhorado e suplementado de forma a evitar as alterações na expressão genética dos embriões que foram associadas a meios de cultura mais ricos e complexos (Purpera, 2009). Assim, no laboratório da Secção de Reprodução e Obstetrícia da FMV adoptou-se a utilização de SOF melhorado, entre outros, com a adição de ácidos aminados essenciais e não essenciais, correntemente denominado de SOFaa.

Para além dos ácidos aminados é também prática comum a adição de soro bovino ao SOFaa. Este é a forma ideal para fornecer às culturas celulares, de um modo geral, e aos embriões em particular, proteínas, vitaminas, fontes energéticas, lípidos e factores de crescimento. Vários estudos indicam que o soro é essencial na produção de embriões *in vitro*, não só na fase de maturação dos ocócitos, mas também como promotor da compactação da mórula e formação do blastocisto, aumentando ainda o número de células por embrião, indicador importante de viabilidade (Gordon, 1994). No entanto, a sua utilização está também associada à formação precoce do blastocelo, aumento da sequestração anormal de lípidos, aumento das células apoptóticas, ultra-estrutura



mitocondrial anormal, perturbações no metabolismo e alterações morfológicas e ainda ao nascimento de crias gigantes nos ruminantes, que aumentam muito a taxa de distócias das crias produzidas por FIV (Gardner, 1999; Purpera, 2009). Os vários estudos que têm sido levados a cabo com o objectivo de substituir eficazmente o soro da cultura de embriões usam maioritariamente 10% de soro nos seus controlos. No entanto, e apesar de alguns resultados observados serem promissores (George, 2008; Gordon, 1994; Momozawa, 2011; Purpera, 2009; Rizos, 2003), o soro continua a ser o suplemento mais completo e economicamente viável. Como tal, no laboratório da Secção de Reprodução e Obstetrícia o soro tem vindo a ser incorporado sob a forma de soro de vaca superovulada em cio (SOCS), na concentração de 5%.

Uma outra abordagem à cultura de embriões *in vitro* é a utilização de sistemas de co-cultura. Inicialmente a co-cultura estava reservada a células do epitélio do oviducto bovino (BOEC) que se pensava serem as mais indicadas na produção de factores embriotróficos naturais. No entanto, vários estudos, revelaram que células de outras espécies, e provenientes de tecidos alheios ao aparelho reprodutor, também são benéficas em sistemas de co-cultura. Assim, têm sido utilizadas, em embriões de várias espécies, linhas celulares comerciais como as células Vero, BRL ou fibroblastos embrionários de ratinho, entre outras (Gordon, 1994). Efectivamente, a principal vantagem da utilização de células em co-cultura é a sua capacidade de metabolizarem ou absorverem do meio de cultura substâncias nocivas aos embriões e, adicionalmente, consumirem o oxigénio que rodeia os embriões, diminuindo desta forma os radicais livres a que os embriões são sensíveis (Imahie, 1992). No entanto, a maioria das células utilizadas em co-cultura continuam a pertencer ao aparelho reprodutor feminino, nomeadamente as BOEC e as células da granulosa, que são de fácil obtenção durante o processo de FIV e igualmente competentes no garante do desenvolvimento embrionário (Pereira, 2009).

Finalmente, é pertinente referir que é prática comum em todas as fases da produção de embriões *in vitro* cobrir os poços de cultura com uma camada de óleo mineral. De facto, os embriões são muito sensíveis às variações de pH e osmolaridade e à concentração de solutos que se verifica com a evaporação da água do meio e, por isso, usa-se o óleo como uma barreira que impede este fenómeno mas possibilita as trocas gasosas. No entanto, é necessário ter em mente que esta barreira, útil aos embriões, pode ser prejudicial quando se tentam medir moléculas lipofílicas no meio, como é o caso das hormonas esteróides, por absorver parte das mesmas, retirando-as da fase aquosa analisada.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Obtenção das suspensões de células lúteas bovinas

Todos os meios de cultura e reagentes utilizados neste trabalho foram da marca Sigma® (adquiridos à Sigma-Aldrich®), excepto o meio de cultura DMEM-F12 e o soro FCS que foram da marca Gibco® (adquiridas à Invitrogen™) e a enzima colagenase que foi da marca Roche (adquirida à Roche Applied Science). As placas de cultura foram da marca Nunc® (adquiridas à VWR). A composição dos meios utilizados no isolamento das células lúteas e na sua cultura *in vitro* está descrita no Anexo I.

As culturas de células lúteas bovinas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir do protocolo de isolamento de células lúteas otimizado e correntemente utilizado no laboratório de Reprodução e Obstetrícia da FMV.

Resumidamente, os corpos lúteos (CL) foram recolhidos e classificados no matadouro de acordo com a classificação proposta por Ireland *et al.* (1980), correspondendo o estadio I à fase precoce do ciclo ou *early*, o estadio II à fase média do ciclo ou *mid* e o estadio III à fase tardia do ciclo ou *late* (Tabela 1 e Figura 3). Os CL foram colocados em PBS e acondicionados em gelo e, transportados até ao laboratório onde foram processados.

**Tabela 1:** Características morfológicas usadas na classificação do CL nos bovinos. Adaptado de Ireland *et al.* (1980).

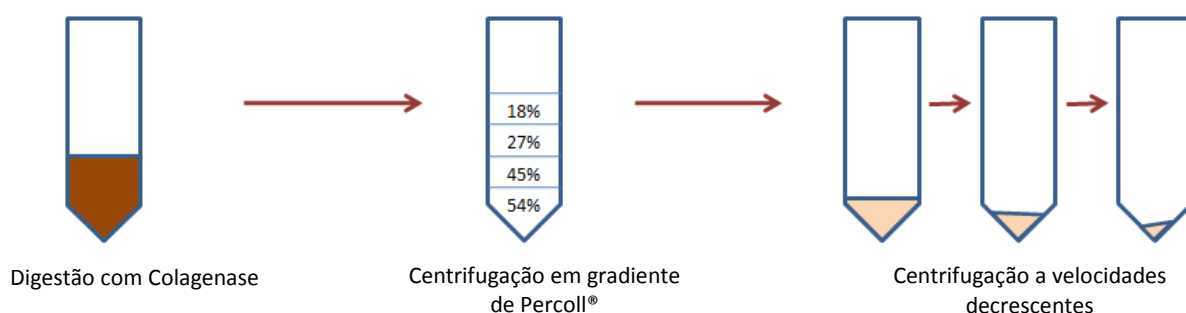
	ESTADIO DO CORPO LÚTEO		
	<i>Early</i> (Precoce)	<i>Mid</i> (Médio)	<i>Late</i> (Tardio)
<b>Dias do ciclo éstrico</b>	1-4	5-10	11-17
<b>Tamanho (cm)</b>	0,5 - 1,5	1,6 – 2	1,6 – 2
<b>Cor exterior</b>	Vermelho vivo	Vermelho-acastanhado no ápex	Amarelo/alaranjado
<b>Superfície</b>	Sem vasculatura exterior visível, sem epitélio no ponto de ruptura do folículo	Vasculatura visível apenas na periferia	Vasculatura a cobrir toda a estrutura



**Figura 3:** Ovários com corpos lúteos dos estádios *early* ou precoce (A), *mid* ou médio (B) e *late* ou tardio (C) do ciclo.

A cápsula fibrosa dos corpos lúteos foi separada mecanicamente e o tecido restante foi cortado em pedaços mais pequenos com o auxílio de um bisturi. Estes foram digeridos em DMEM-F12 + 0,2% collagenase + 0,1% DNase numa estufa a 37°C com agitação suave e permanente durante 3 períodos de 15 minutos. A suspensão obtida foi depois centrifugada num gradiente descontinuo de Percoll® durante 20 minutos a 400×g e foram recuperadas as células nas interfaces 18-27% e 27-45%, como descrito por Fridén *et al.* (1999). Finalmente, estas células foram centrifugadas sucessivamente em períodos de 5 minutos com forças centrífugas decrescentes (400×g, 200×g e 56×g) de forma a recuperar maioritariamente as células mais pesadas (esteroidogénicas).

**Figura 4:** Representação esquemática do protocolo de obtenção das suspensões de células lúteas bovinas.



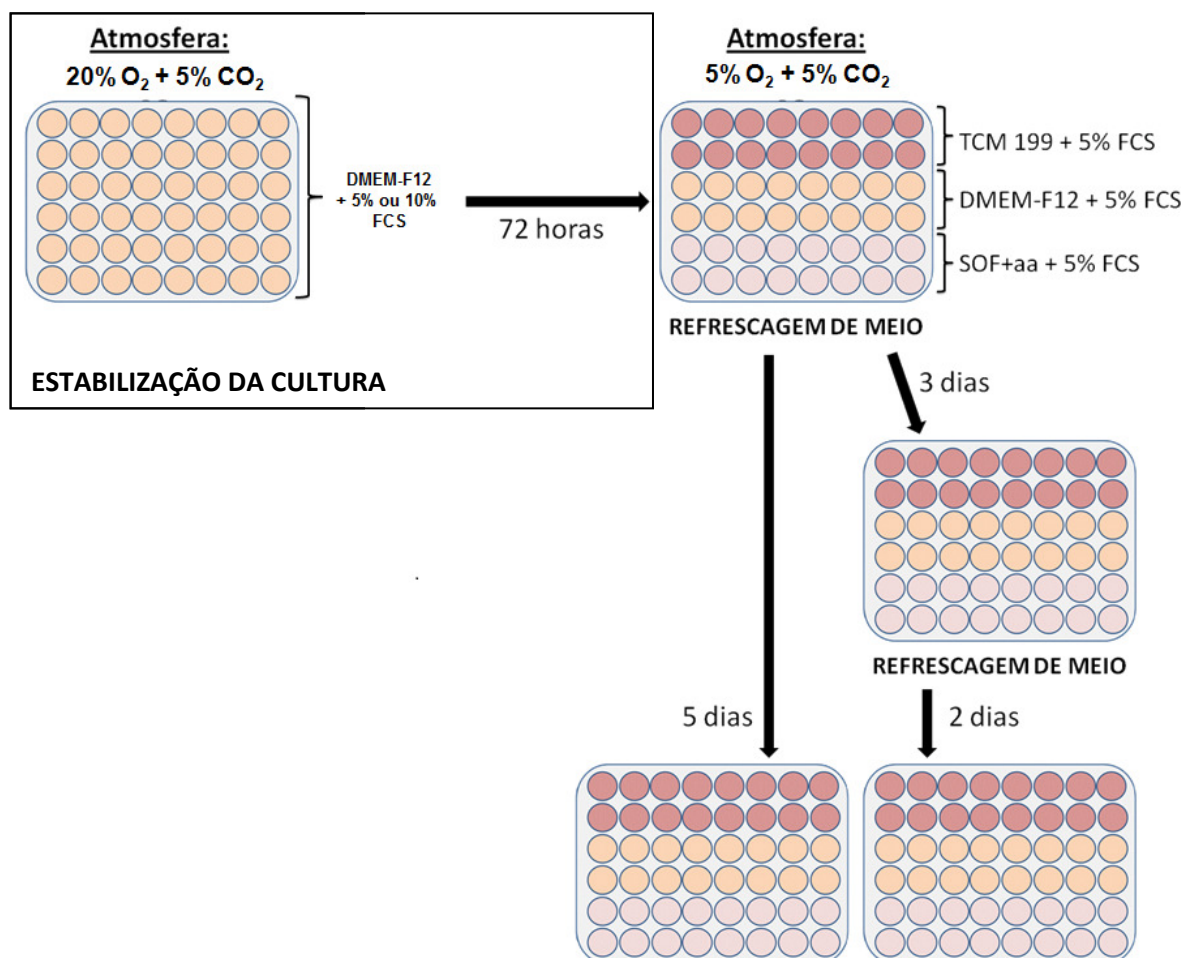
A viabilidade das células obtidas foi avaliada com Azul Tripano a 1,6%, numa diluição de 1:10, e a concentração calculada após contagem em câmara de Neubauer. Com base na concentração de células viáveis (não coradas) obtida, foram feitas as diluições apropriadas para realizar o plaqueamento dos poços de cultura.

## 2. Ensaio I:

Foram processados como descrito acima 5 *pools* de CL da fase *early*, 5 *pools* de CL da fase *mid* e 4 *pools* de CL da fase *late*, com 2 a 6 CL por *pool* em 7 sessões de cultura. As células obtidas foram plaqueadas em 500µL de DMEM-F12 suplementado com 5 ou 10% FCS em placas de 48 poços com uma concentração inicial da suspensão celular de  $10^5$  células /poço e, incubadas na estufa a 39°C com uma atmosfera de 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas para estabilização da cultura (com refrescagem total do meio às 24 horas).

Após as 72 horas de estabilização, o meio foi totalmente substituído por TCM-199, DMEM-F12 ou SOFaa suplementados com 5% de FCS e os poços de cultura cobertos com óleo mineral. As placas foram incubadas a 39°C numa atmosfera com 5% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> durante mais 5 dias. Metade dos poços foi refrescada com novo meio de cultura ao dia 3. Foram colhidas amostras dos meios aos dias 0, 3 e 5 e armazenadas em tubos de polipropileno a -20°C até serem processadas para quantificação de P<sub>4</sub> por radioimunoensaio (RIA). A Figura 5 ilustra esquematicamente os passos e a cronologia do ensaio I.

**Figura 5:** Representação esquemática das placas de cultura utilizadas no ensaio I e das condições a que foram sujeitas

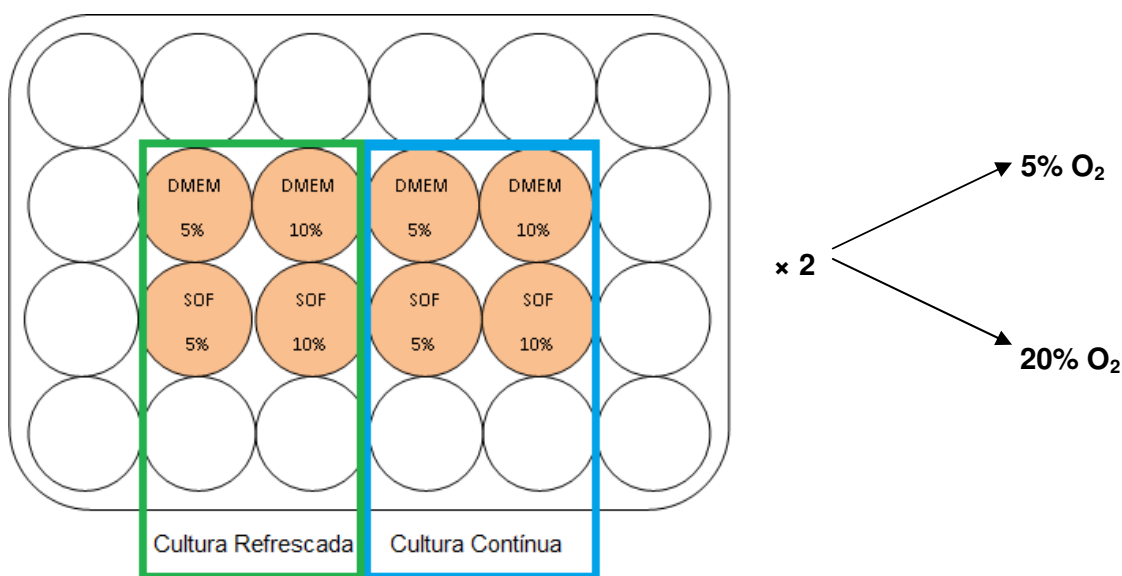


### 3. Ensaio II:

Foram processados 6 CL da fase *early* e 6 CL da fase *mid* em 4 sessões de cultura. As células obtidas de cada CL foram plaqueadas em 500 $\mu$ L de DMEM-F12 + 10% FCS em duas placas de 24 poços com uma concentração inicial da suspensão celular de  $1,25 \times 10^5$  células/poço e incubadas na estufa a 39°C com uma atmosfera de 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas, para estabilização da cultura.

O meio foi então totalmente substituído por DMEM-F12 com 5 ou 10% de FCS ou por SOFaa com 5 ou 10% de FCS e uma das placas foi mantida numa atmosfera com 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>, sendo a outra selada numa atmosfera com 5% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>. Ambas as placas foram incubadas durante 5 dias na estufa a 39°C. Em metade dos poços estimulados, em ambas as placas, procedeu-se à recolha do meio de 24 em 24 horas (D0, D1, D2, D3, D4 e D5), com substituição da totalidade do mesmo por meio fresco. Nos restantes poços o meio não foi refrescado durante toda a fase de cultura, sendo recolhido apenas ao D5. Os meios recolhidos foram armazenados em tubos de polipropileno a -20°C até serem processados para quantificação de P<sub>4</sub> por RIA. A Figura 6 ilustra esquematicamente uma placa de cultura utilizada no ensaio II.

**Figura 6:** Representação esquemática de uma placa de cultura utilizada no ensaio II.

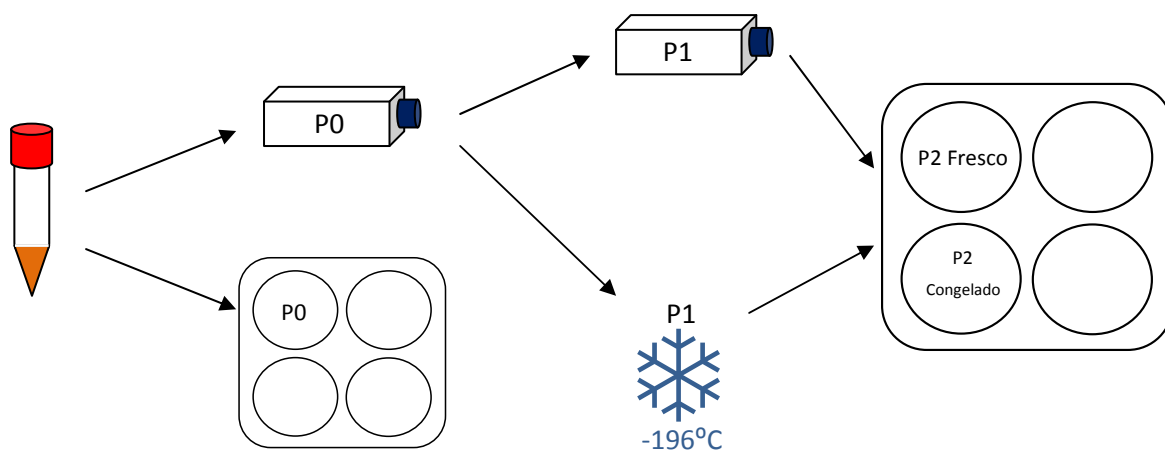


#### 4. Ensaio III:

Foram processados 7 *pools* de 1 a 2 CL da fase *early* em 4 sessões de cultura. Parte da suspensão inicialmente obtida de cada *pool* foi plaqueada (cultura primária ou P0) em 500µL de DMEM-F12 + 10% FCS em placas de 48 poços com uma concentração inicial da suspensão celular de  $2 \times 10^5$  células/poço e incubada na estufa a 39°C com uma atmosfera de 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas para estabilização da cultura. Após esse período o meio foi totalmente refresco e as células colocadas em cultura durante mais 24 horas, momento em que a cultura foi terminada. Colheram-se amostras de meio às 0, 24 e 48 horas de cultura.

A restante suspensão foi plaqueada em 5 mL de DMEM-F12 + 10% FCS em frascos de cultura T25 com  $4,3 \times 10^6$  a  $6,9 \times 10^6$  células/frasco e incubada na estufa a 39°C com uma atmosfera de 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>. Ao atingir cerca de 90% de confluência, o tapete celular de cada frasco foi tripsinizado e metade da suspensão obtida foi congelada em azoto líquido (-196°C) com o crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) numa diluição de 1:10 em DMEM-F12 + 10% FCS, sendo a outra metade novamente plaqueada num T25 em 5 mL de DMEM-F12 + 10% FCS de forma a realizar a primeira subcultura (P1 – passagem 1). Ao atingir a confluência, estas células foram tripsinizadas e as células do *pool* correspondente descongeladas. Ambas as suspensões de segunda subcultura (P2 – passagem 2) de cada *pool* – fresca e congelada – foram plaqueadas em 500µL de DMEM-F12 + 10% FCS em placas de 48 poços com uma concentração inicial de  $2 \times 10^5$  células/poço e incubadas na estufa a 39°C com uma atmosfera de 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> em condições semelhantes às aplicadas à P0. Colheram-se amostras de meio às 0 e 48 horas de cultura. Todas as amostras de meio colhidas foram armazenadas em tubos de polipropileno a -20°C até serem processadas para quantificação de P<sub>4</sub> por RIA. A Figura 7 ilustra esquematicamente os passos do ensaio III.

**Figura 7:** Representação esquemática dos procedimentos de ensaio III



## 5. Ensaio IV:

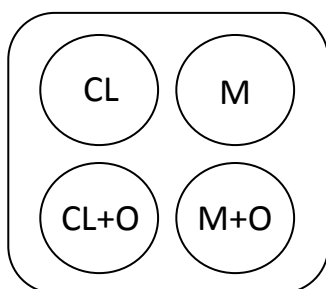
### a) Obtenção de *stock* de células lúteas em P2

Foram processados 3 *pools* de 6 a 8 CL da fase *early* em 3 sessões de cultura. As suspensões obtidas foram plaqueadas em frascos de cultura T25 em 5 mL de DMEM-F12 + 10% FCS com  $5 \times 10^6$  a  $7 \times 10^6$  células/frasco, sendo incubadas na estufa a 39°C, com uma atmosfera com 20% O<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub>. Depois de atingida uma confluência de cerca de 90%, os tapetes celulares foram tripsinizados e as suspensões celulares congeladas em DMSO (diluição de 1:10) em ampolas e conservadas a -196°C até serem usadas.

### b) Cultura das células lúteas

Ampolas dos 3 “stocks” obtidos em a) foram descongeladas e as células utilizadas em 4 sessões de cultura. As ampolas foram descongeladas e a suspensão celular plaqueada em placas de 4 poços em 500µL de DMEM-F12 + 10% FCS com uma concentração inicial de  $2,5 \times 10^4$  células/poço. As placas foram incubadas na estufa a 39°C e 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas de forma a estabilizar a cultura. Os poços foram então refrescados com 400µL de SOFaa + 5% SOCS, sendo metade destes recobertos com 400µL de óleo mineral. Adicionalmente, foram incubados nas mesmas placas poços com meio de cultura recobertos ou não com óleo mineral. A Figura 8 ilustra esquematicamente uma placa de cultura utilizada no ensaio IV.

**Figura 8:** Esquema representativo de uma placa de cultura do ensaio IV. CL = células lúteas em SOFaa+5% SOCS; CL+O = células lúteas em SOFaa+5% SOCS com recobertura de óleo mineral; M = SOFaa+5% SOCS; M+O = SOFaa+5% SOCS com recobertura de óleo mineral



As placas foram seladas numa atmosfera com 5% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> e incubadas durante 5 dias em banho-maria a 39°C com circulação de água. Ao quinto dia, o meio de todos os poços foi recolhido e armazenado em tubos de polipropileno a -20°C até ser processado para quantificação de P<sub>4</sub> por RIA.

## **6. Doseamento de progesterona.**

A concentração de  $P_4$  nos meios foi doseada por radioimunoensaio (RIA), utilizando o contador gama automático 1470 Wizard™ (Wallac®) e o kit comercial Coat-a-Count® (Siemens®), cuja sensibilidade é de 0,02 ng/mL.

Foram efectuadas 25 sessões de RIA, nas quais todas as amostras, pontos de calibração e controlos foram medidos em duplicado em tubos de interior revestido com anti-corpo anti- $P_4$  fornecido no kit. Os doseamentos foram repetidos em todas as amostras cujo coeficiente de variação foi superior a 15%, no caso de concentrações até 1 ng/mL, e superior a 10%, no caso de concentrações superiores a 1 ng/mL.

A curva padrão de cada sessão foi determinada com os calibradores fornecidos no kit, com as concentrações de 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 20 e 40 ng/mL. Amostras com concentrações esperadas de  $P_4$  superiores a 40 ng/mL foram diluídas nos respectivos meios de cultura (TCM-199, DMEM-F12 ou SOFaa) para que a leitura obtida estivesse dentro dos limites da curva de calibração. Em todas as sessões foram utilizados controlos comerciais (Con6, Siemens®), cujas leituras foram depois usadas para calcular o coeficiente de variação inter-ensaio. Foram ainda determinadas em cada sessão as contagens totais (radiação emitida por 1 mL de  $^{125}\text{I}$  marcado com  $P_4$ ), assim como as ligações não específicas (radiação emitida por  $^{125}\text{I}$  marcado com  $P_4$ , mas não ligado aos anti-corpos anti- $P_4$ ) em tubos não revestidos com anti-corpo anti- $P_4$ .

As contagens por minuto (cpm) lidas pelo contador gama foram registadas e a sua conversão em ng/mL, assim como o coeficiente de variação entre leituras dos duplicados de cada amostra, foi determinado pelo programa Multicalc v.5 ® (Wallac®).

Os coeficientes de variação inter-ensaio e intra-ensaio foram calculados segundo o método de Rodbard *et al.* (1971). O coeficiente inter-ensaio, calculado com base nos controlos, foi de 8,45% para o nível de 1,9 ng/mL, 9,7% para o nível de 3,7 ng/mL e 10,7% para o nível de 17,4 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,3%.

## **7. Análise Estatística**

### **a) Geral**

Os valores da concentração de  $P_4$  no meio de cultura foram ordenados em ficheiros do programa informático Microsoft Office Excel 2007® (Microsoft®) e exportados para o programa informático Statistica Release 7® (Statsoft 2004®). Com este último programa foi



realizada uma análise estatística descritiva com determinação do valor de  $n$ , média, mediana, erro padrão, quartil superior e inferior e intervalo de confiança de 95%.

Após a aplicação dos testes de Hartley, Cochran, Bartlett e Levene aos valores da concentração de  $P_4$ , verificou-se que nenhuma das populações de dados (ensaios) apresentava uma distribuição normal. Fez-se então a transformação  $\log x + 1$  dos valores do ensaio I e II. Os testes acima mencionados aplicados à amostra assim transformada mostraram que esta apresentava uma distribuição normal. Como tal, procedeu-se à análise estatística com modelos lineares gerais, utilizando testes de análise de variância (ANOVA). Para a análise dos ensaios III e IV usaram-se testes não paramétricos.

Para efeitos da inferência estatística, o nível de probabilidade de se verificar a hipótese nula testado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### b) Ensaio I

Os efeitos fixos do estadio do CL (*early*, *mid* e *late*), do meio de cultura (TCM-199, DMEM-F12 e SOFaa), da concentração do soro no meio de cultura na fase de estabilização (5% e 10%) e as suas interações, sobre a produção de  $P_4$  pelas células em cultura, foram avaliados pela aplicação de uma análise de variância factorial. Os efeitos significativos foram analisados *post-hoc* pelo teste Fisher-LSD.

O efeito da refrescagem do meio sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura foi avaliado por análise de variância simples.

#### c) Ensaio II

Os efeitos fixos do estadio do CL (*early* e *mid*), do meio de cultura (DMEM-F12 e SOFaa), da concentração do soro no meio de cultura (5% e 10%), da tensão de oxigénio na atmosfera de cultura (5% e 20%) e as suas interações, sobre a produção de  $P_4$  pelas células em cultura, foram avaliados por análise de variância factorial com medidas repetidas (número de medições repetidas:  $n=7$ , aos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do ensaio). Os efeitos significativos foram analisados *post-hoc* pelo teste Fisher-LSD.

O efeito da refrescagem do meio sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura foi avaliado com um teste T para amostras independentes.

#### d) Ensaio III

O efeito da congelação sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura foi avaliado com a aplicação do teste de Mann-Whitney.

#### e) Ensaio IV

O efeito da cobertura do meio de cultura com óleo mineral sobre a concentração de  $P_4$  no meio ao fim de 5 dias de cultura foi avaliado com a aplicação do teste T para amostras com variâncias desiguais.

## V. RESULTADOS

### 1. Ensaio I

A média da viabilidade das suspensões celulares usadas para plaquear os poços de cultura foi de  $73\% \pm 5$  para o estadio *early*,  $61\% \pm 6$  para o estadio *mid* e  $56\% \pm 7$  para o estadio *late*. Ao microscópio óptico invertido, as células lúteas provenientes de diferentes estadios de CL apresentaram comportamentos distintos, notando-se um crescimento mais rápido nas células do estadio *early*, seguido do verificado nas células do estadio *mid*. Os poços de cultura com as células do estadio *late* apresentavam ao dia 5 de cultura tapetes celulares menos confluentes e maior quantidade de detritos celulares em suspensão.

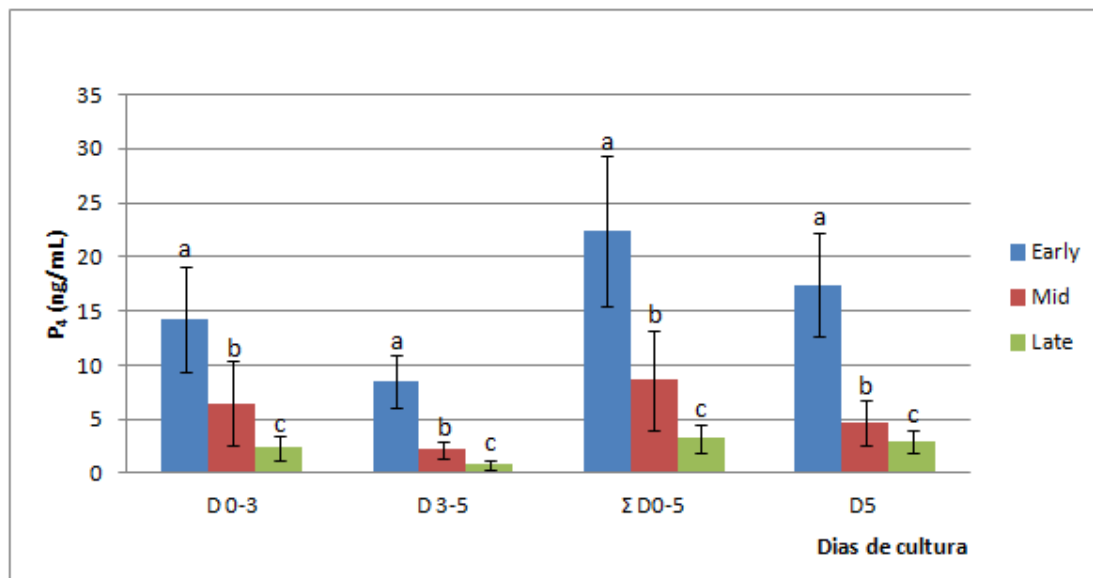
A Tabela 1 apresenta os valores de p para os diferentes efeitos fixos do modelo estatístico. O estadio do CL e o meio de cultura usado influenciaram significativamente a produção de  $P_4$ . Os restantes efeitos não se revelaram significativos.

**Tabela 2:** Valores de p para os efeitos fixos do teste de ANOVA factorial aplicados às concentrações de  $P_4$  no meio de cultura

Efeito	Valor de p
Estadio do CL	0
Meio de cultura	0,000011
Concentração de soro	0,68
Estadio CL × Meio	0,73
Estadio CL × Soro	0,46
Meio × Soro	0,95
Estadio × Meio × Soro	0,99

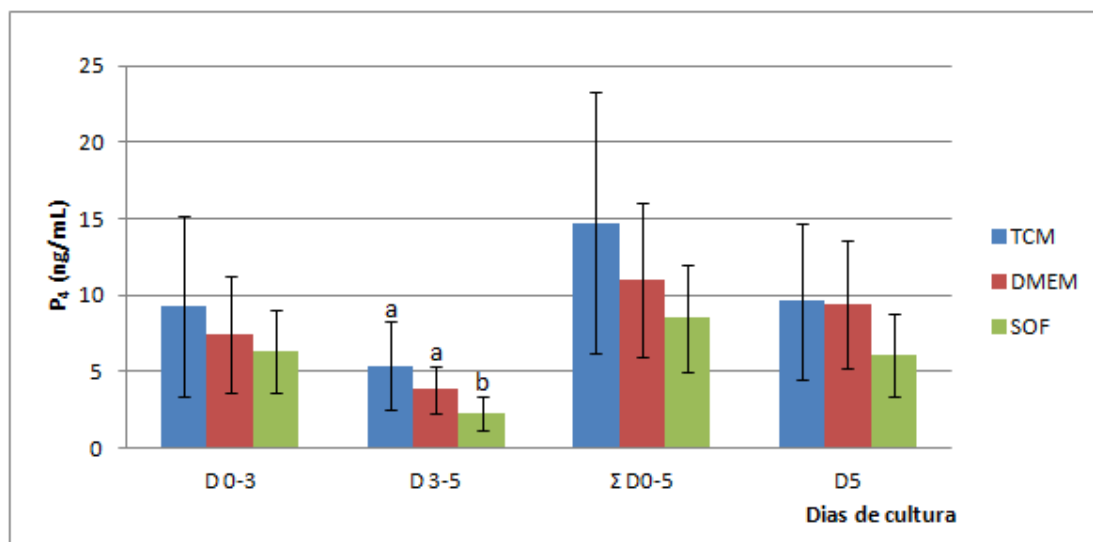
O Gráfico 1 representa o resultado da análise *post-hoc* do efeito fixo estadio do CL sobre as concentrações de  $P_4$ . Os três estadios do CL são significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes entre si em todos os momentos avaliados.

**Gráfico 1:** Análise *post-hoc* (Fisher-LSD) do efeito fixo estadio do CL sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. D0-3 = produção de  $P_4$  entre os dias 0 e 3; D3-5 = produção de  $P_4$  entre os dias 3 e 5;  $\Sigma$ D0-5 = somatório de D0-3 com D3-5; D5 = produção de  $P_4$  entre os dias 0 e 5 (cultura contínua). Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).



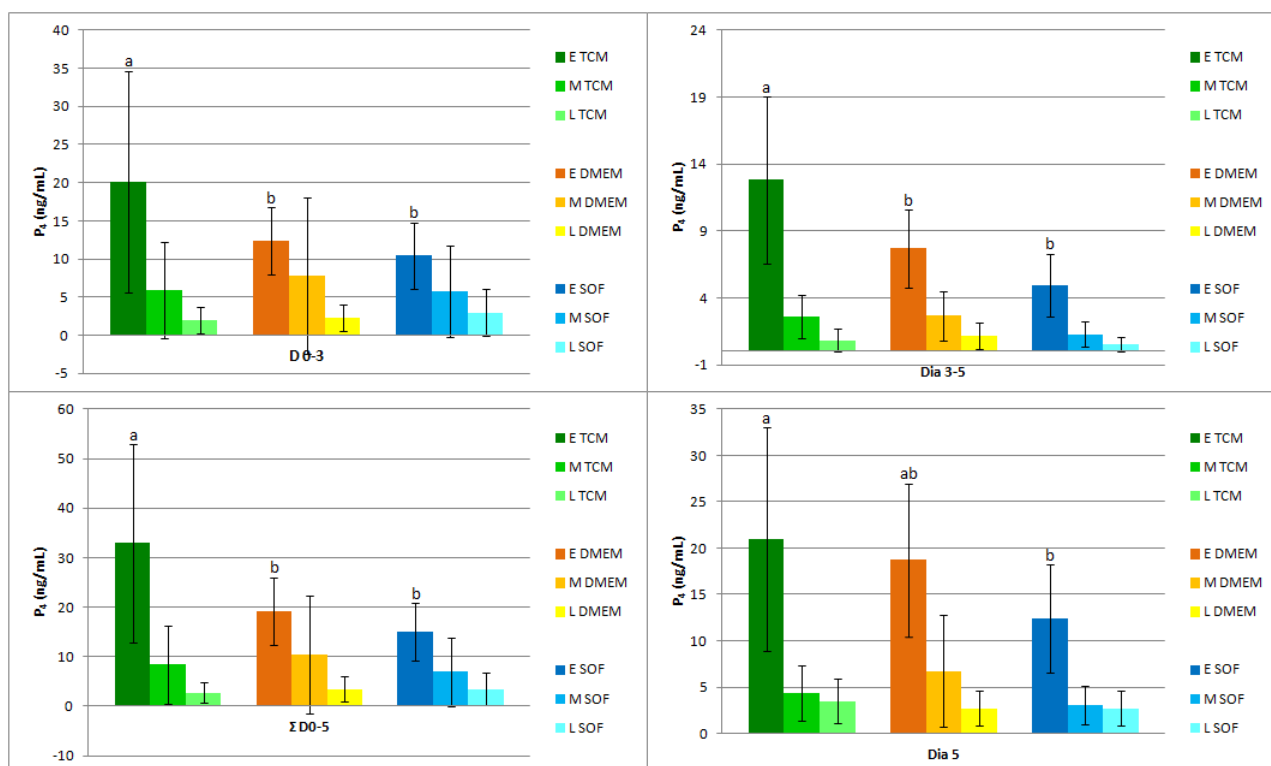
A análise *post-hoc* do efeito fixo meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  mostrou que só se verificou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de  $P_4$  nos dias 3-5 entre os meios TCM-199 e DMEM-F12 e o meio SOFaa (Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Análise *post-hoc* (Fisher-LSD) do efeito fixo meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. D0-3 = produção de  $P_4$  entre os dias 0 e 3; D3-5 = produção de  $P_4$  entre os dias 3 e 5;  $\Sigma$ D0-5 = somatório de D0-3 com D3-5; D5 = produção de  $P_4$  entre os dias 0 e 5 (cultura contínua). Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ( $p = 0,034$ ).



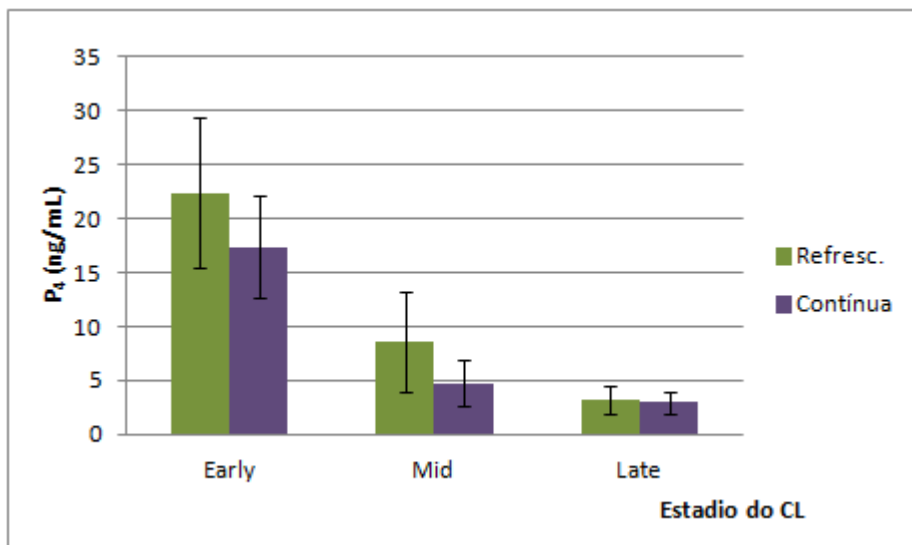
O Gráfico 3 ilustra o resultado do teste *post-hoc* da interação estágio do CL x meio de cultura. Conforme pode ser observado, apesar de ambos os efeitos referidos se terem revelado significativos, a sua interação não foi significativa.

**Gráfico 3:** Análise *post-hoc* (Fisher-LSD) da interação dos efeitos fixos estágio do CL x meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura. Estádios: *Early* (E); *Mid* (M); e *Late* (L); meios de cultura: TCM-199 (TCM); DMEM-F12 (DMEM); e SOFaa (SOF). As barras de erro representam os intervalos de confiança. D0-3 = produção de  $P_4$  entre os dias 0 e 3; D3-5 = produção de  $P_4$  entre os dias 3 e 5;  $\Sigma$ D0-5 = somatório de D0-3 com D3-5; D5 = produção de  $P_4$  entre os dias 0 e 5 (cultura não refrescada). Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).



O Gráfico 4 representa o efeito da refrescagem do meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura, provenientes de diferentes estádio de CL. A refrescagem do meio de cultura não mostrou ter efeito significativo na quantidade de  $P_4$  produzida pelas células lúteas em cultura de qualquer dos estádios de CL.

**Gráfico 4:** Efeito da refrescagem do meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. Refresc. = produção de  $P_4$  em 5 dias de cultura com refrescagem total do meio ao terceiro dia; Contínua = produção de  $P_4$  em 5 dias sem refrescagem do meio.



## 2. Ensaio II

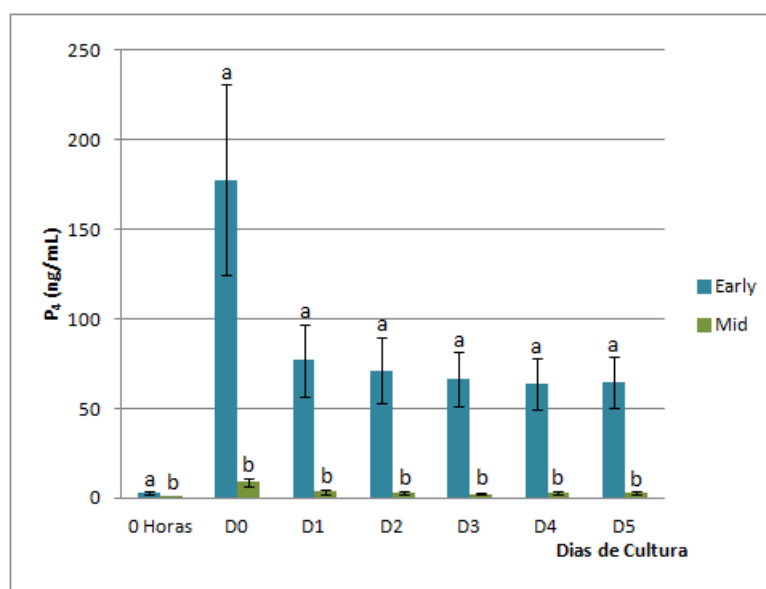
A média da viabilidade das suspensões celulares usadas para plaquear os poços de cultura foi  $52\% \pm 10$  para o estadio *early* e  $60\% \pm 11$  para o estadio *mid*. Visualmente, as diferenças entre as velocidades de crescimento das células lúteas dos CL de estadios *early* e *mid*, verificadas no ensaio anterior, continuaram a observar-se, de forma mais acentuada, possivelmente devido à baixa concentração celular inicial e à utilização de poços de cultura com uma maior área disponível. Assim, verificou-se que os tapetes celulares provenientes do estadio *early* atingiram cerca de 90% de confluência ao dia 5 de cultura, enquanto os tapetes celulares do estadio *mid* não ultrapassaram confluências de cerca de 60% para o mesmo tempo de cultura.

A Tabela 2 apresenta os valores de  $p$  para o modelo estatístico da ANOVA factorial com medidas repetidas. Conforme pode ser observado, apenas o efeito fixo estadio do CL teve efeito significativo sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura. Adicionalmente a análise das medidas repetidas mostrou que a produção de  $P_4$  variou significativamente ao longo do tempo de cultura e que o efeito fixo estadio do CL influenciou significativamente esta variação. A análise *post-hoc* dos efeitos fixos do modelo estatístico (estadio do CL, meio de cultura, concentração de soro e tensão de oxigénio) estão ilustrados nos Gráficos 5 a 8.

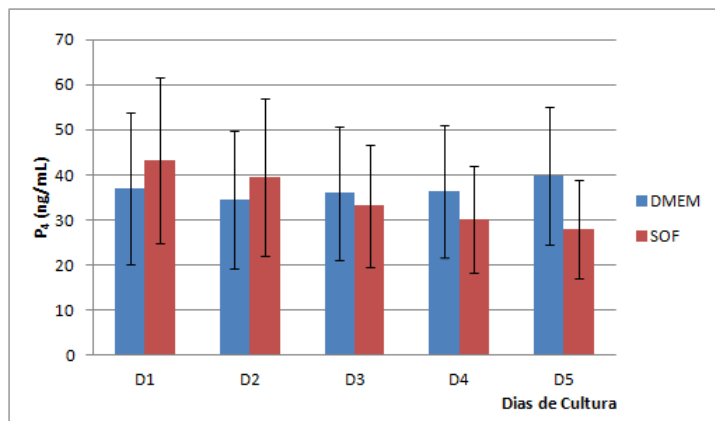
**Tabela 3:** Valores de p obtidos do modelo estatístico pelo teste de ANOVA com medidas repetidas aplicado às concentrações de P<sub>4</sub> no meio de cultura.

Efeito	Valor de p	Efeito	Valor de p
Estadio do CL (CL)	0	P <sub>4</sub>	0
Meio de cultura (Meio)	0,93	P <sub>4</sub> × CL	0
Concentração de soro (S)	0,65	P <sub>4</sub> × Meio	0,17
Tensão de Oxigênio (Ox)	0,68	P <sub>4</sub> × S	0,75
CL × Meio	0,84	P <sub>4</sub> × Ox	0,33
CL × S	0,91	P <sub>4</sub> × CL × Meio	0,96
Meio × S	0,53	P <sub>4</sub> × CL × S	0,99
CL × Ox	0,78	P <sub>4</sub> × Meio × S	0,73
Meio × Ox	0,78	P <sub>4</sub> × CL × Ox	0,81
S × Ox	0,97	P <sub>4</sub> × Meio × Ox	0,95
CL × Meio × S	0,96	P <sub>4</sub> × S × Ox	0,99
CL × Meio × Ox	0,98	P <sub>4</sub> × CL × Meio × S	0,99
CL × S × Ox	0,77	P <sub>4</sub> × CL × Meio × Ox	0,99
Meio × S × Ox	0,88	P <sub>4</sub> × CL × S × Ox	0,99
CL × Meio × S × Ox	0,77	P <sub>4</sub> × Meio × S × Ox	0,99
		P <sub>4</sub> × CL × Meio × S × Ox	0,97

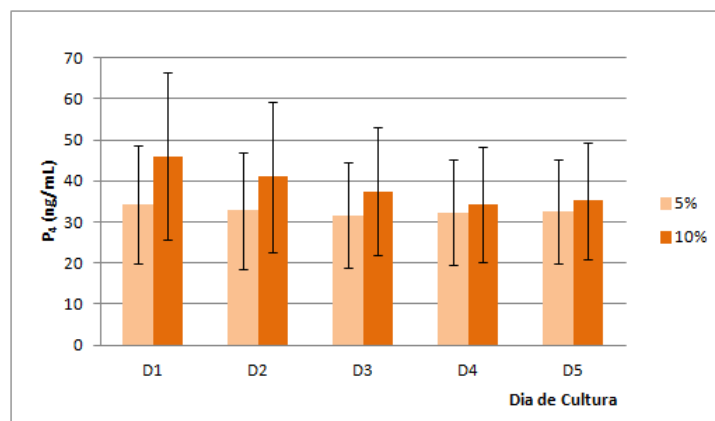
**Gráfico 5:** Análise *post-hoc* (Fisher LSD) do efeito do estadio do CL sobre a produção de P<sub>4</sub> por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. 0 horas = P<sub>4</sub> presente na suspensão celular a plaquear; D0 = produção de P<sub>4</sub> durante a estabilização da cultura; D1 a D5 = produção de P<sub>4</sub> pelas células lúteas em cultura em cada dia de estimulação. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p≈0,00).



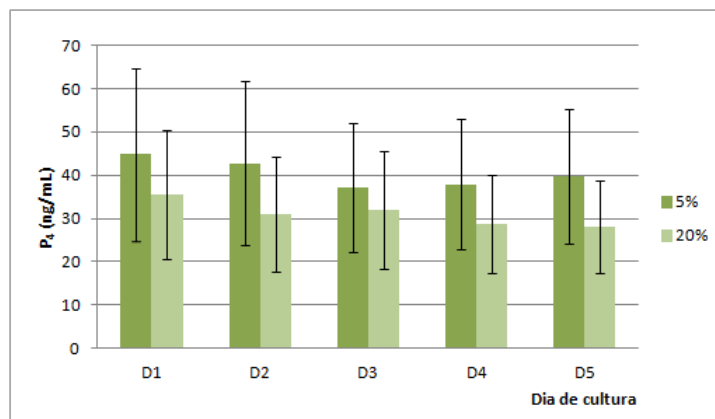
**Gráfico 6:** Análise *post-hoc* (Fisher LSD) do efeito do meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. As colunas D1, D2, D3, D4 e D5 correspondem à  $P_4$  produzida pelas células lúteas em cultura em cada dia de cultura. DMEM = DMEM-F12; SOF = SOFaa.



**Gráfico 7:** Análise *post-hoc* (Fisher LSD) do efeito da concentração de soro no meio de cultura (5% ou 10%) sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. As colunas D1, D2, D3, D4 e D5 correspondem à  $P_4$  produzida pelas células lúteas em cultura em cada dia de cultura.

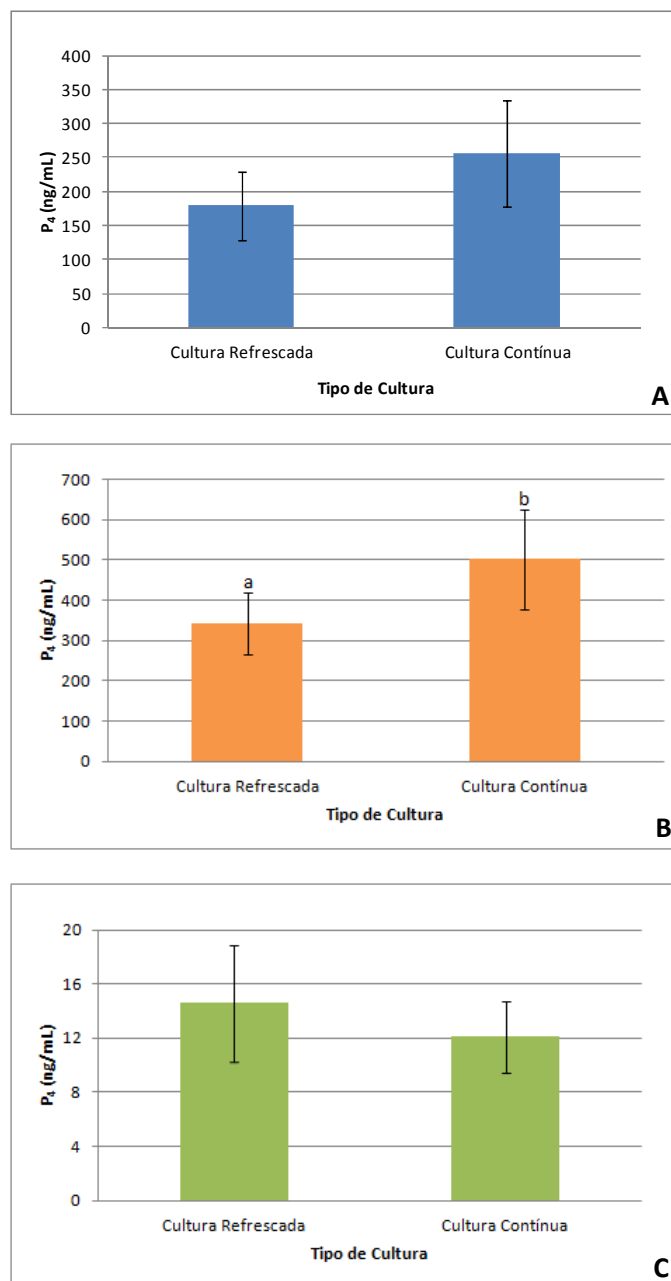


**Gráfico 8:** Análise *post-hoc* (Fisher LSD) do efeito da tensão de oxigênio na atmosfera de cultura (5% ou 20%) sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. As colunas D1, D2, D3, D4 e D5 correspondem à  $P_4$  produzida pelas células lúteas em cultura em cada dia de cultura.



O Gráfico 9 ilustra o efeito da refrescagem do meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura. Conforme pode ser observado, a refrescagem não teve um efeito significativo na quantidade total de  $P_4$  produzida pelas células lúteas em cultura. No entanto, este efeito foi observado quando consideradas apenas as células provenientes de CL do estadio *early*.

**Gráfico 9:** Efeito da refrescagem do meio de cultura sobre a produção de  $P_4$  por células lúteas em cultura. As barras de erro representam os intervalos de confiança. Cultura refrescada = produção total de  $P_4$  pelas células lúteas durante 5 dias com refrescagem diária do meio de cultura; Cultura contínua = produção de  $P_4$  pelas células lúteas durante 5 dias sem refrescagem do meio. Em A é mostrada a produção de  $P_4$  pelas células lúteas de ambos os estadios de CL; em B a produção de  $P_4$  pelas células lúteas do estadio *early*; e em C a produção de  $P_4$  pelas células lúteas do estadio *mid*. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (A:  $p=0,098$ ; B:  $p=0,030$  e C:  $p=0,327$ ).





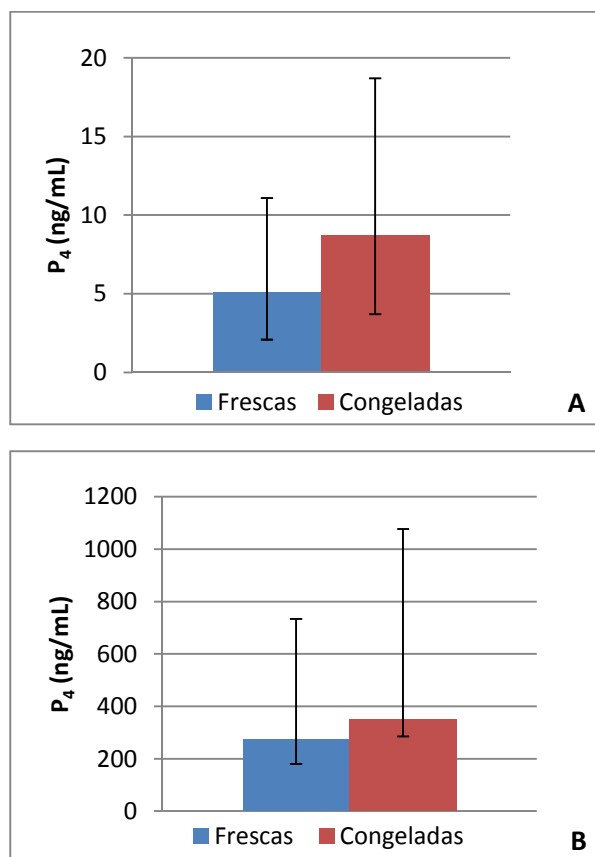
### 3. Ensaio III:

A média da viabilidade das suspensões celulares usadas para plaquear os poços de cultura foi  $59\% \pm 6$  para a cultura primária,  $94\% \pm 2$  para a subcultura sem congelação prévia e  $86\% \pm 3$  para a subcultura com congelação prévia. Visualmente, tanto a cultura primária como as segundas subculturas (congelada e fresca) comportaram-se da mesma forma, atingindo cerca de 80% de confluência nas primeiras 24 horas de cultura e cerca de 100% de confluência às 48 horas de cultura.

As células lúteas da cultura primária, produziram uma média de  $1441,54 \pm 556,74$  ng/mL de  $P_4$  entre as 24 e as 48 horas de cultura.

O Gráfico 10 ilustra o efeito do tipo de células lúteas da subcultura (fresca ou congelada) sobre a produção de  $P_4$  no meio recolhido às 0 horas e às 48 horas da subcultura. A congelação prévia da suspensão celular não afectou significativamente a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura.

**Gráfico 10:** Efeito da congelação das células lúteas sobre a produção de  $P_4$  às 0 horas (A) e às 48 horas (B) de cultura. No gráfico estão representadas as medianas da amostra e os quartis superior e inferior. Não houve diferença significativa na produção de  $P_4$  pelos dois tipos de suspensões celulares (frescas ou previamente congeladas) (teste de Mann-Whitney).



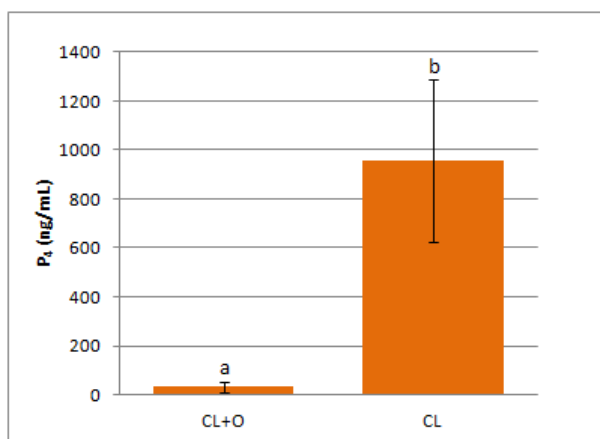
#### 4. Ensaio IV

A média da viabilidade das suspensões celulares usadas para plaquear os poços de cultura neste ensaio foi  $76\% \pm 7$ . Ao microscópio óptico invertido, os tapetes celulares de ambos os grupos (com e sem cobertura de óleo) apresentaram-se com cerca de 90% de confluência ao fim dos 5 dias de cultura.

O meio de cultura isoladamente, com e sem cobertura de óleo mineral apresentou uma concentração média negligenciável de  $P_4$  ( $<0,007\text{ng/mL}$ ). A  $P_4$  presente no meio tem origem provável no soro presente na sua constituição. A presença de  $P_4$  nos meios de cultura das células lúteas em cultura durante 5 dias após a sua descongelação, quer cobertas ou não com óleo mineral, mostra que estas mantêm a sua função esteroidogénica em condições desenhadas especificamente para a cultura de embriões bovinos *in vitro*.

A cobertura com óleo mineral afectou significativamente a concentração de  $P_4$  no meio de cultura, conforme é ilustrado no Gráfico 11. A concentração de  $P_4$  foi em média cerca de 50 vezes maior nas culturas não recobertas por óleo mineral do que nas recobertas pelo mesmo óleo.

**Gráfico 1110:** Efeito da cobertura com óleo mineral na concentração de  $P_4$  medida no meio de cultura após 5 dias de cultura. No gráfico estão representadas as médias e os intervalos de confiança (barras de erro). CL+O = células lúteas com óleo mineral; CL = células lúteas sem óleo mineral. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ( $p=0,0000008$ ).



## VI. DISCUSSÃO

O CL é uma estrutura fulcral no estabelecimento e manutenção da gestação nos mamíferos através da produção de  $P_4$ . Assim, o estudo das suas interacções com o embrião é fundamental na compreensão dos fenómenos que ocorrem na fase inicial da gestação na espécie bovina. De forma a estudar estas interacções surgiu a necessidade de desenvolver um modelo de cultura de células lúteas bovinas *in vitro* compatível com o sistema de cultura de embriões bovinos *in vitro*.

Neste trabalho observou-se que as células lúteas do CL bovino têm uma boa capacidade de adaptação à cultura celular *in vitro* e mantêm, não só a sua viabilidade, mas também a sua função esteroidogénica principal – a produção de  $P_4$ . No entanto, esta capacidade das células varia com a idade do CL (estadio) de origem e vai diminuindo à medida que avançamos no ciclo éstrico. Assim, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios I e II, podemos afirmar que as células do estadio *early* (1 a 4 dias após a ovulação) têm uma melhor capacidade de adaptação à cultura *in vitro*, seguidas das células do estadio *mid* (5 a 10 dias após a ovulação). As células do estadio *late* (11 a 17 dias após a ovulação) são as que pior se adaptam às condições *in vitro*, tendo um crescimento mais fastidioso em cultura e uma menor capacidade de produção de  $P_4$ . Este fenómeno, parece seguir o comportamento do CL *in vivo*, que vê o seu crescimento estabilizado entre o 6º e o 9º dia do ciclo éstrico (Ireland, 1980) e onde a sua função e dependência de estímulos parácrinos e endócrinos vai variando ao longo do ciclo (Niswender, 1994; Schams, 2004).

Adicionalmente, verificou-se que as células lúteas, nos sistemas de cultura testados, têm uma grande capacidade de adaptação a condições de cultura mais restritivas. Efectivamente, os ensaios I e II mostraram que a produção de  $P_4$  não era afectada utilizando o SOFaa em vez de meios mais completos como o TCM-199 ou o DMEM-F12. Para além do tipo de meio de cultura, as concentrações de soro usadas na sua suplementação (5% e 10%), também não influenciaram a função esteroidogénica das células, nem na fase da estabilização da cultura (ensaio I), nem na fase da cultura (ensaio II). No ensaio I, o aporte de maior concentração de soro (10%) às células lúteas antes da sua exposição às condições experimentais, não parece ter promovido o armazenamento de reservas lipídicas intracelulares relevantes que permitissem uma maior produção de  $P_4$  quando em cultura, comparativamente com células cuja fase de estabilização foi suplementada com 5% de soro. No ensaio II, os resultados indicam que 5% de soro no meio de cultura (a concentração da cultura *in vitro* de embriões) veicula os nutrientes e os factores de crescimento necessários para a manutenção da viabilidade e função esteroidogénica das células.

As células avaliadas no ensaio II mostraram-se também bastante tolerantes em relação à tensão de oxigénio da atmosfera de cultura. Os resultados indicam que células lúteas provenientes de CL em estadios *early* e *mid* não sofreram alterações significativas na capacidade de produção de  $P_4$  sob os efeitos da hipóxia (5% de  $O_2$ ) necessária à cultura de embriões bovinos *in vitro*. Estas observações estão em parte de acordo com o trabalho de Okuda *et al.* (2010) que afirma que a hipóxia (3%  $O_2$ ) é um factor estimulante para a formação do CL e não altera a produção de  $P_4$  pelas células lúteas deste estadio de CL. Contudo, neste ensaio também não se observaram efeitos negativos para as células lúteas provenientes de CL do estadio *mid*, com a utilização de uma atmosfera de cultura com apenas 5% de  $O_2$ , comparativamente com uma atmosfera com 20% de  $O_2$ , o que contraria o relatado por Okuda *et al.* (2008 e 2010)

Outra condição essencial à cultura de embriões *in vitro* é a cobertura dos poços de cultura com óleo mineral (Gordon, 1994). Esta prática foi testada na cultura de células lúteas no ensaio IV, onde se verificou que a presença de óleo mineral diminuiu muito significativamente a  $P_4$  quantificada no meio de cultura. Este fenómeno é facilmente explicável tendo em conta a natureza lipofílica da  $P_4$ , que é uma hormona esteróide (derivada do colesterol). Assim, à medida que esta vai sendo produzida pelas células lúteas em cultura, difunde-se para o óleo, saindo do meio de cultura (aquoso). É desta forma lógico assumir que a quantificação de  $P_4$  analisando apenas a fracção aquosa deste tipo de sistemas de cultura, subestima a quantidade de  $P_4$  que é efectivamente produzida. De facto, no ensaio IV observou-se um factor multiplicativo de cerca de 50 vezes entre a concentração de  $P_4$  quantificada na cultura não coberta por óleo, em relação à coberta por óleo mineral.

Foi ainda testado o efeito da refrescagem do meio de cultura de células lúteas sobre a produção total de  $P_4$ . Em teoria, esta refrescagem pode ter dois efeitos possíveis e contrários. Por um lado, pode ser benéfica à produção de  $P_4$  pelas células em cultura, ao impedir o esgotamento dos nutrientes disponíveis para as células e remover os produtos do metabolismo celular que possam ser nocivos. Por outro lado, deve ter-se em consideração que a  $P_4$  é uma hormona luteotrófica que estimula a síntese dos seus receptores nas células lúteas, promovendo a sua própria produção (Rekawiecki, 2005; Skarzynski, 2008). Assim sendo, a sua remoção no acto da refrescagem impede a estimulação autócrina e parácrina das células lúteas e pode prejudicar a sua produção. Neste trabalho, não se observaram efeitos significativos nas células lúteas provenientes dos estadios *early*, *mid* ou *late* nas condições de cultura do ensaio I. No entanto, no ensaio II, ao contrário do que seria previsível pelos resultados do ensaio I, observou-se um aumento significativo da produção de  $P_4$  pelas células lúteas dos CL no estadio *early* em cultura contínua (onde o meio não foi refrescado) em comparação com as mesmas células que tiveram refrescagem do meio de

cultura. Uma explicação para esta discrepância poderá advir da diferença entre os dois sistemas de cultura utilizados nos ensaios I e II: a presença de óleo mineral no ensaio I, ao aprisionar a  $P_4$  produzida poderá ter impedido a sua acção autócrina e parácrina, enquanto no ensaio II, a  $P_4$  produzida ao acumular-se no meio de cultura durante 5 dias, poderá ter estimulado a sua própria produção. Provavelmente, a refrescagem não alterou significativamente a quantidade de  $P_4$  produzida pelas células lúteas provenientes de CL do estadio *mid* nas condições do ensaio II, devido à menor produção de  $P_4$  por estas células, comparativamente à produção das células provenientes de CL no estadio *early*.

A possibilidade de criopreservação das células lúteas bovinas foi avaliada nos ensaios III e IV. Os resultados do ensaio III mostram que a criopreservação não teve efeitos nocivos sobre a viabilidade celular nem sobre a capacidade esteroidogénica das células lúteas, quando comparada com a subcultura das mesmas células a fresco. Os resultados do ensaio IV indicam que células lúteas criopreservadas mantêm a sua função esteroidogénica em condições óptimas para a cultura de embriões *in vitro* e podem por isso ser usadas em sistemas de co-cultura com embriões bovinos em estudos sobre as interacções embrio-maternas.

## VII. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de cultura *in vitro* de células lúteas de bovino que permite a co-cultura com embriões em condições óptimas para estes últimos, mantendo a viabilidade e a capacidade esteroidogénica das células. Especificamente, foram validados os seguintes aspectos:

- a) Estadio do CL: o estadio que melhor se adaptou às condições de cultura *in vitro*, com base na viabilidade e capacidade esteroidogénica demonstradas pelas células lúteas foi o estadio *early* (precoce);
- b) Meio de cultura: a cultura num meio apropriado para embriões (SOFaa) não afectou significativamente a viabilidade e a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura;
- c) Concentração de soro: a presença de concentrações de soro apropriadas para a cultura de embriões *in vitro* (5%) não afectou significativamente a viabilidade nem a produção de  $P_4$  pelas células lúteas em cultura, comparativamente com o observado para concentrações típicas da cultura *in vitro* de células somáticas (10%);

- d) Tensão de oxigénio: a presença de uma atmosfera de cultura hipóxica (5% O<sub>2</sub>) não afectou significativamente a viabilidade e a produção de P<sub>4</sub> pelas células lúteas em cultura comparativamente com o observado para a atmosfera que normalmente contacta com os tecidos *in vivo* (20% O<sub>2</sub>);
- e) Refrescagem do meio de cultura: esta prática só teve efeito na capacidade esteroidogénica das células lúteas em cultura provenientes de CL do estadio *early*, na ausência da cobertura do poço de cultura com óleo mineral;
- f) Cobertura com óleo mineral: esta prática não afectou a viabilidade das células em cultura mas reduziu significativamente a quantificação de P<sub>4</sub> no meio de cultura; este aspecto deverá ser tido em consideração quando se pretender avaliar as interacções entre o embrião e células esteroidogénicas em co-cultura;
- g) Criopreservação: esta prática não afectou a viabilidade nem a produção esteroidogénica das células lúteas em cultura, comparativamente a células frescas provenientes do mesmo *pool* inicial. Este resultado valida a possibilidade de realização de *pools* de células criopreservadas que poderão ser utilizadas em ensaios realizados em momentos temporais diferentes, permitindo uma melhor homogeneidade dos sistemas culturais e uma melhor repetibilidade das condições experimentais.

Face a estes resultados, foi elaborado um sistema cultural *in vitro* de células lúteas para ulteriores ensaios de co-cultura com embriões bovinos, que apresenta as seguintes características:

- a) As células lúteas provêm de CL no estadio *early*;
- b) O meio de cultura consiste em SOFaa, suplementado com 5% de soro;
- c) A tensão de O<sub>2</sub> da atmosfera de cultura é de 5%;
- d) A refrescagem do meio de cultura poderá ser realizada a meio do tempo de cultura;
- e) O *pool* inicial de células lúteas a utilizar nos ensaios deverá ser criopreservado por forma a descongelar lotes com comportamento homogéneo durante todo o período do ensaio experimental.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, T.J., Yoshioka, S., Komiyama J., Lee S.H., Grazul-Bilska A.T., Skarzynski D.J. & Okuda K. (2007). Effects of storage and passage of bovine luteal endothelial cells on endothelin-1 and prostaglandin F2 $\alpha$  production. *Journal of Reproduction and Development*, 53 (3), 473-480.
- Arikan, S. & Rodway, R.G. (2000). Effects of high density lipoprotein containing high or low beta-carotene concentrations on progesterone production and beta-carotene uptake and depletion by bovine luteal cells. *Animal Reproduction Science*, 62, 253-263.
- Asselin, E., Lacroix, D. & Fortier, M.A. (1997). IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 132(1-2), 117-126.
- Brackett, R.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. & Dressel, M.A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27, 147-158.
- Carroll, D.J., Grummer, R.R. & Mao, F.C. (1992). Progesterone production by cultured luteal cells in the presence of bovine low- and high-density lipoproteins purified by heparin affinity chromatography. *Journal of Animal Science*, 70, 2516-2526.
- Del Vecchio, R.P., Thibodeaux, J.K., Randelt, R.D. & Hansel, W. (1994). Interactions Between Large and Small Bovine Luteal Cells in a Sequential Perifusion Co-Culture System. *Journal of Animal Science*, 72, 963-968.
- Diskin M.G. & Morris, D.G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Supplement 2), 260-267.
- Ferreira-Dias, G., Costa, A.S., Mateus, L., Korzekwa, A.J., Galvão, A., Redmer, D.A., Lukasik, K., Szóstek, A.Z., Woclawek-Potocka, I. & Skarzynski, D.J. (2011). Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E2 secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology*, 40(1), 1-9.
- Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F. & Crowe, M.A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.025
- Freshney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells - A manual of basic technique* (5<sup>a</sup> edição ed.): Wiley Publishing.
- Fridén, B.E., Hagström, H., Lindblom, B., Sjöblom, P., Wallin, A., Brännström, M. & Hahlin, M. (1999). Cell characteristics and function of two enriched fraction of human luteal cells prolonged culture. *Molecular Human Reproduction*, 5(8), 714-719.
- Gardner, D.K. (1999). Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *Journal of reproduction and fertility Supplement*, 54, 461-475.
- Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T. & Morgan, G.L. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84(2), 437-446.
- George, F., Daniaux, C., Genicot, G., Verhaeghe, B., Lambert, P. & Donnay, I. (2008). Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, 69(5), 612-623.

- Gordon, I. (1994). Laboratory Production of Cattle Embryos (Vol. nº 11): CAB International.
- Goyeneche, A.A., Harmon, J.M. & Telleria, C.M. (2006). Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction*, 131, 103-111.
- Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., Johnson, M.L., Jablonka-Shariff, A., Bilski, J.J & Reynold, L.P. (1996). Gap Junctional Protein Connexin 43 in Bovine Corpora Lutea Throughout the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction*, 54, 1279-1287.
- Hunter, R.H.F. (2009). Temperature gradients in female reproductive tissues and their potential significance. *Animal Reproduction*, 6(1), 7-15.
- Imahie, H., Nito, S., Kobayashi, T. & Ariyuki, F. (1992). Overcoming the mouse 2-cell block by co-culture with established cell lines. *Journal of Reproduction and Development*, 38, 267-270.
- Ireland, J.J., Murphee, R.L. & Coulson, P.B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *Journal of Dairy Science*, 63, 155-160.
- Juengel, J.L. & Niswender, G.D. (1999). Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*(Supplement 54), 193-205.
- Kerbler, T.L., Buhr, M., Jordan, L.T., Leslie, K.E. & Walton, J.S. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*, 47(3), 703-714.
- Kohen, P., Castro, A., Caballero-Campo, P., Castro, O., Veja, M., Makrigiannakis, A., Simón, C., Carvallo, P. & Devoto, L. (1998). Interleukin-1beta (IL-1beta) is a modulator of human luteal cell steroidogenesis: localization of the IL type I system in the corpus luteum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(11), 4239-4245.
- Lee, S.H., Acosta, T., Yoshioka, S. & Okuda, K. (2009). Prostaglandin F(2alpha) regulates the nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells. *Journal of Reproduction and Development*, 55(4), 418-424.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S. & Wathes, D.C. (1999). The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*(Supplement 54), 317-328.
- Masters, J.R.W. (2000). *Animal Cell Culture* (3ª edição ed.): Oxford University Press.
- May, K.C., Bobe, G., Mueller, C.J. & Cannon, M.J. (2011). Conjugated linoleic acid decreases prostaglandin synthesis in bovine luteal cells in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 78(5), 328-336.
- Meidan, R., Milvae, R.A., Weiss, S., Levy, N. & Friedman, A. (1999). Intraovarian regulation of luteolysis. *Journal of Reproduction and Fertility*(Supplement 54), 217-228.
- Meier, S., Ledgard, A.M., Sato, T.A., Peterson, A.J. & Mitchell, M.D. (2009). Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF(2alpha) and PGE(2) release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. *Animal Reproduction Science*, 111(2-4), 353-360.
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2007). *Leite e Lacticínios - Diagnóstico Sectorial*. Lisboa: Gabinete de Planeamento e Políticas.



- Momozawa, K. & Fukuda, Y. (2011). Establishment of an Advanced Chemically Defined Medium for Early Embryos Derived from In Vitro Matured and Fertilized Bovine Oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, Epub ahead of print.
- Ndikum-Moffor, F.M., Simmen, R.C.M., Fields, P.A., Katoh, N., Oikawa, S., Buhi, W.C., Rollyson, M.K., Chang, S.T., & Fields, M.J. (1997). Synthesis and Messenger Ribonucleic Acid Expression of Apolipoproteins E and A-I by the Bovine Corpus Luteum during the Estrous Cycle and Pregnancy. *Biology of Reproduction*, 56, 745-756.
- Nishimura, R. & Okuda, K. (2010). Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 56(1), 110-116.
- Nishimura, R., Komiyama, J., Tasaki, Y., Acosta, T.J. & Kiyoshi Okuda. (2008). Hypoxia Promotes Luteal Cell Death in Bovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*, 78, 529-236.
- Niswender, G. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123, 333-339.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J., Belfiore, C.J. & Wiltbank, M.C.. (1994). Luteal Function: The Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Biology of Reproduction*(50), 239-247.
- Pereira, R.M., Marques, C.C., Baptista, M.C., Vasques, M.I. & Horta, A.E.M (2009). Embryos and culture cells: A model for studying the effect of progesterone. *Animal Reproduction Science*, 111, 31-40.
- Purpera, M.N., Giraldo, A.M., Ballard, C.B., Hylan, D., Godke, R.A. & Bondioli, K.R. (2009). Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 76(8), 783-793.
- Rekawiecki, R., Kowalik, M.K., Slonina, D. & Kotwica, J. (2008). Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(Supplement 9), 75-89.
- Rekawiecki, R., Nowik, M. & Kotwica, J. (2005). Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 78(1-4), 169-184.
- Reynolds, L.P. & Redmer, D.A. (1999). Growth and development of the corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*(Supplement 54), 181-191.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.P. & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68(1), 236-243.
- Robinson, R.S., Hammond, A.J., Wathes, D.C., Hunter, M.G. & Mann, G.E. (2008). Corpus Luteum–Endometrium–Embryo Interactions in the Dairy Cow: Underlying Mechanisms and Clinical Relevance. *Reproduction in Domestic Animals*, 43((Supplement 2)), 104-112.
- Rocha, A., Martins A. & Carnevalheira, J. (2010). Fertility Time Trends in Dairy Herds in Northern Portugal. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 896-899.

- Rodbard, D., Ruder, H.J., Vaitukaitis, J. & Jacobs, H.S. (1971) Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 33, 343-355.
- Saint-Dizier, M., Guyader-Joly, C., Charpigny, G., Grimard, B., Humblot, P. & Ponter, A.A. (2011). Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine in vitro-produced embryos. *Zygote*, 19(3), 277-283.
- Santos, J.E., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L. & Galvão, K.N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 513-535.
- Schams, D. & Berisha, B. (2004). Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 39 (4), 241-251.
- Shibaya, M., Deptula, K.M., Korzekwa, A., Okuda, K. & Skarzynski, D.J. (2005) Involvement of the cytoskeleton in oxytocin secretion by cultured bovine luteal cells. *Biology of Reproduction*, 72(1), 200-205.
- Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G. & Okuda, K. (2008). Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Supplement 2), 57-65.
- Sugino, N., Hirose-Takamori, M., Zhong, L., Telleria, C.M., Shiota, K. & Gibori, G. (1998). Hormonal regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum: induction by prolactin and placental lactogens. *Biology of Reproduction*, 59(3), 599-605.
- Sugino, N., Zilberstein, M., Srivastava, R.K., Telleria, C.M., Nelson, S.E., Risk, M., Chou, J.Y. & Gibori, G. (1998). Establishment and Characterization of a Simian Virus 40-Transformed Temperature-Sensitive Rat Luteal Cell Line. *Endocrinology*, 139(4), 1936-1942.
- Thibodeaux, J.K., Broussard, J.R., Grodke, R.A. & Hansel, W. (1994). Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 657-662.
- Weems, C.W., Weems, Y.S. & Randel, R.D. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary Journal*, 171(2), 206-228.
- Woclawek-Potocka, I., Kondraciuk, K. & Skarzynski, D.J. (2009). Lysophosphatidic acid stimulates prostaglandin E2 production in cultured stromal endometrial cells through LPA1 receptor. *Experimental Biology and Medicine*, 234(8), 986-993.
- Yang, L., Wang, X.L., Wan, P.C., Zhang, L.Y., Wu, Y., Tang, D.W. & Zeng, S.M. (2010). Up-regulation of expression of interferon-stimulated gene 15 in the bovine corpus luteum during early pregnancy. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 1000-1011.
- Yuan, Y.Q., VanSoom, S.A., Coopman, F.O., Mintiens, K., Boerjan, M.L., VanZeveren, A., de Kruif, A. & Peelman, L.J. (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, 59(7), 1585-1596.

## IX. ANEXO I

### 1. Meios para Isolamento de Células Lúteas

#### a) Meio de Transporte

	<b>Concentração</b>	<b>Referência</b>	<b>Marca</b>
Dulbecco's PBS		21300-017	Gibco®
Penicilina	100 UI/mL	15140-122	Gibco®
Estreptomicina	100 µg/mL		
BSA	1 %	A7906	Sigma®

#### b) Meio de Digestão

	<b>Concentração</b>	<b>Referência</b>	<b>Marca</b>
DMEM-F12		11039-021	Gibco®
Colagenase A	0,2 %	10103578001	Roche®
DNase I	0,1 %	D5025-15KU	Sigma®
BSA	1 %	A7906	Sigma®

#### c) Meio de Centrifugação

	<b>Concentração</b>	<b>Referência</b>	<b>Marca</b>
DMEM-F12		11039-021	Gibco®
FCS	2 %	26140-079	Gibco®
Anfotericina	2,5 µg/mL	A2942	Sigma®
Gentamicina	0,05 mg/mL	G1522	Sigma®
BSA	0,1 %	A7906	Sigma®

## 2. Meios para Cultura das Células Lúteas

### a) TCM-199

	Concentração	Referência	Marca
TCM-199		M2154	Sigma®
Anfotericina	2,5 µg/mL	A2942	Sigma®
Gentamicina	0,05 mg/mL	G1522	Sigma®
BSA	0,1 %	A7906	Sigma®
ITS	1 µL/mL	I3146	Sigma®

### b) DMEM-F12

	Concentração	Referência	Marca
DMEM-F12		11039-021	Gibco®
Anfotericina	2,5 µg/mL	A2942	Sigma®
Gentamicina	0,05 mg/mL	G1522	Sigma®
BSA	0,1 %	A7906	Sigma®
ITS	1 µL/mL	I3146	Sigma®

### c) SOFaa

#### i. Solução Stock A

	Concentração	Referência	Marca
H <sub>2</sub> O Embryo Tested		W1503	Sigma®
NaCl	62.9 mg/mL	S5886	Sigma®
KCl	5,34 mg/mL	P5405	Sigma®
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,62 mg/mL	P5655	Sigma®
MgSO <sub>4</sub>	1,82 mg/mL	S2643	Sigma®
Ácido Láctico (60%)	4,68 mg/mL	L7900	Sigma®

#### ii. Solução Stock B

	Concentração	Referência	Marca
H <sub>2</sub> O Embryo Tested		W1503	Sigma®
NaHCO <sub>3</sub>	21 mg/mL	S4019	Sigma®
Vermelho Fenol	10 µg/mL	P4633	Sigma®

#### iii. Solução Stock C

	Concentração	Referência	Marca
H <sub>2</sub> O Embryo Tested		W1503	Sigma®
Ácido Pirúvico	8 mg/mL	P3662	Sigma®

iv. Solução Stock D

	<b>Concentração</b>	<b>Referência</b>	<b>Marca</b>
H <sub>2</sub> O Embryo Tested		W1503	Sigma®
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	26,2 mg/mL	C7902	Sigma®

v. Solução SOFaa final

	<b>Concentração</b>	<b>Referência</b>	<b>Marca</b>
H <sub>2</sub> O Embryo Tested		W1503	Sigma®
Tri-citrato de Sódio	0,1 mg/mL	6448.1000	Merck®
Mio-Inositol	0,1 mg/mL	I7508	Sigma®
Stock A	0,1 mL/mL		
Stock B	0,1 mL/mL		
Stock C	0,01 mL/mL		
Stock D	0,01 mL/mL		
BME (50×)	0,03 mL/mL	B6766	Sigma®
MEM (100×)	0,01 mL/mL	M7145	Sigma®
L-Glutamina	0,02923 mg/mL	G5763	Sigma®
Sulfato de Gentamicina	0,05 mg/mL	G1522	Sigma®
ITS	1 µL/mL	I3146	Sigma®